

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE
Faculté de génie
Département de génie chimique et de génie biotechnologique

CONCENTRATION ET TRANSFORMATION DE LA BIOMASSE
ALGALE DANS UN PROCÉDÉ SYNERGIQUE DE PRODUCTION DE
BIOCARBURANT

Mémoire de maîtrise
Spécialité: génie chimique et biotechnologique

Joey LABRANCHE

Jury: Jean-Michel Lavoie (directeur)
Véronique BERBERI
Esteban CHORNET
Denis GROLEAU

RÉSUMÉ

Ce projet présente une méthode, ainsi que des résultats, visant à contrer deux verrous technologiques limitant actuellement la production à échelle industrielle de biomasse microalgale soit : 1) la concentration (dewatering) de cette biomasse et 2) l'extraction de métabolites d'intérêt (carbohydrates, lipides, protéines) à partir de ce substrat. Dans ce projet, de la lignocellulose et de la cellulose sont utilisées pour la concentration de la solution microalgale, agissant comme média filtrant. L'avantage conceptuel de la méthode proposée est qu'elle s'intègre à des procédés établis. Dans un premier temps, une étape de pré-concentration sera utilisée afin de diminuer le volume de la solution d'algues envoyée à la filtration (qui est l'étape majeure de la concentration) tout en permettant la récupération d'une portion du milieu de culture. Cette étape s'effectuera via une variation de la concentration ionique du milieu pour induire la floculation et la sédimentation des algues. Dans un second temps, pour permettre la filtration des algues, une préparation préalable de la fibre (lignocellulosique et cellulosique) selon des traitements à la vapeur de différentes sévérités permettra de voir l'influence de ces traitements sur les paramètres physiques des fibres. Cette opération permettra d'une part d'évaluer l'influence de ce prétraitement sur l'efficacité de filtration, et d'autre part, de l'adapter aux conditions opérationnelles en industrie. L'objectif est de bien saisir la capacité de filtration des différents médias afin d'optimiser la filtration des microalgues sans avoir à modifier significativement les paramètres d'opération actuels du système de vapocraquage. Une fois les algues captées par les fibres, le mélange d'algues et de fibres est ensuite traité de 2 façons différentes dépendamment du type de filtration effectuée. La méthode proposée va différer selon la composition initiale des microalgues. Si la concentration en lipides est plus élevée que la concentration en sucres, la filtration sur la lignocellulose va être utilisée pour ensuite transformer, par vapocraquage, l'ensemble microalgues-lignocellulose en intermédiaires valorisables dérivés des lipides et des sucres. Si, à l'inverse, la concentration en sucre est plus élevée, la cellulose servira de média filtrant pour ensuite être hydrolysée par un traitement non enzymatique. Le procédé, qui éventuellement découlera de la méthode proposée, pourra alors être adapté aux différentes souches de microalgues dans l'objectif final de production de différents types de biocarburants et/ou biocommodités. La méthode développée exige que les cultures de microalgues soient faites à proximité de bioraffineries existantes, car les quantités de cellulose et, surtout, de lignocellulose nécessaire sont supérieures aux quantités d'algues retenues. La méthode fait du sens si des eaux usées produites dans la bioraffinerie ou à proximité peuvent être traitées par les microalgues (totalement ou en partie en combinaison avec des boues activées). Alors de telles microalgues et boues (si applicable) seraient converties en intermédiaires valorisables une fois récupérées dans les filtres.

Mots-clés: *microalgues, biocarburant, lignocellulose, cellulose, fermentation, vapocraquage*

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 - ÉTAT DE L'ART.....	5
2.1 PROCÉDÉ DE TRANSFORMATION DES ALGUES	5
2.1.1 <i>Séparation et concentration</i>	5
2.1.2 <i>Extraction</i>	7
2.1.3 <i>Conversion</i>	8
2.2 PRINCIPE DU VAPOCRAQUAGE	10
CHAPITRE 3 - MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	12
3.1 DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION D'ALGUES.....	12
3.2 PRÉ-CONCENTRATION PAR COAGULATION/FLOCULATION.....	13
3.3 VAPOCRAQUAGE POUR PRODUCTION DE MÉDIA FILTRANT.....	14
3.4 FILTRATION.....	15
3.4.1 <i>Type de filtration</i>	15
3.4.2 <i>Mise en forme du filtre</i>	15
3.4.3 <i>Procédure de filtration</i>	17
3.5 VAPOCRAQUAGE DES ALGUES	17
3.6 FERMENTATION	18
CHAPITRE 4 - RÉSULTATS	19
4.1 TYPE DE FILTRATION.....	19
4.2 FLOCULATION	19
4.3 FILTRATION.....	26
4.3.1 <i>Type de fibres</i>	26
4.3.2 <i>Dimension des fibres</i>	28
4.3.3 <i>Compaction initiale des fibres</i>	30
4.3.4 <i>Masse de média filtrant</i>	31
4.3.5 <i>Concentration de la solution d'algues</i>	32
4.4 DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION INITIALE DES ALGUES.....	33
*MANNOSE, GALACTOSE, FRUCTOSE (MÊME TEMPS DE RÉTENTION).....	34
4.5 VAPOCRAQUAGE DES ALGUES	34
4.6 FERMENTATION	40
CHAPITRE 5 - DISCUSSION.....	44
5.1 COAGULATION / FLOCULATION.....	44
5.2 FILTRATION.....	44
5.3 VAPOCRAQUAGE	45
5.4 HYDROLYSE ACIDE / FERMENTATION	47
5.5 BILAN DE MASSE.....	47
5.6 ANALYSE ÉCONOMIQUE.....	52
CHAPITRE 6 - CONCLUSION	54
ANNEXE.....	55
Liste des références	72

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Projection de consommation de biocarburants 2009-2022 [EPA, 2013]	2
Figure 2.1 Principales méthodes de concentration des algues [adaptée de Show et al., 2013]	5
Figure 2.2 Différentes méthodes de rupture des algues [adaptée de Halim et al., 2012]	7
Figure 2.3 Technologies de conversion de la biomasse algale [adaptée de Brennan et Owende, 2010].....	9
Figure 3.1 Courbe de calibration pour le dosage de <i>Scenedesmus</i> sp. AMDD par spectrophotomètre UV/Vis à une longueur d'onde de 685 nm.....	12
Figure 3.2 Presse utilisée (volume de 1,7 L) pour la mise en forme des filtres et pour effectuer les filtrations.	16
Figure 3.3 Exemple de filtre de lignocellulose de <i>Salix miyabeana</i> produit à l'aide de la presse, compactée à 50 psi et ayant un diamètre de 10 cm.....	16
Figure 4.1 Variation de la concentration de NaOH en fonction du temps de sédimentation de <i>Scenedesmus</i> sp. AMDD à 2g/L avec une concentration de 10 mM de $MgSO_4$	21
Figure 4.2 Variation de la transmittance en fonction de la concentration de NaOH après 15 min et 45 min de sédimentation avec <i>Scenedesmus</i> sp. AMDD à 2 g/L et 10 mM $MgSO_4$	21
Figure 4.3 Photo au microscope (AmScope B120C-E) de <i>Scenedesmus</i> sp. AMDD après sédimentation avec 10% m/m NaOH et 10 mM H_2SO_4 (400x).....	22
Figure 4.4 Variation de la concentration de $Ca(OH)_2$ en fonction du temps de sédimentation de <i>Scenedesmus</i> sp. AMDD à 1 g/L avec une concentration de 10 mM de $MgSO_4$	23
Figure 4.5 Variation de la transmittance en fonction de la concentration de $Ca(OH)_2$ après 15 min et 45 min de sédimentation avec <i>Scenedesmus</i> sp. AMDD à 1 g/L et 10 mM de $MgSO_4$	23
Figure 4.6 Variation de la concentration de $MgSO_4$ en fonction du temps de sédimentation de <i>Scenedesmus</i> sp. AMDD à 2 g/L avec une concentration de 23 mM de $Ca(OH)_2$	24
Figure 4.7 Variation de la transmittance en fonction de la concentration de $MgSO_4$ après 15 min et 45 min de sédimentation avec <i>Scenedesmus</i> sp. AMDD à 2 g/L et 23 mM de $Ca(OH)_2$	24
Figure 4.8 Photos au microscope (AmScope B120C-E) des microalgues après traitement avec 23 mM $Ca(OH)_2$ et 10 mM $MgSO_4$. A) Microalgues dans la phase non précipitée après 24 h (400x) et B) sédimentées (400x) .	25
Figure 4.9 Test de mise à l'échelle pour l'efficacité de la floculation de <i>Scenedesmus</i> sp. AMDD avec des solutions d'algues de 2 g/L dans 23 mM de $Ca(OH)_2$ et 10 mM $MgSO_4$	25
Figure 4.10 <i>Scenedesmus</i> sp. AMDD, envoyée par le CNRC, observée au microscope inversé à épifluorescence Zeiss (Axio Observer D1) (630x).....	26
Figure 4.11 Procédé utilisé pour la production des fibres lignocelluloses (210°C / 3 min) et des fibres cellulosiques (210°C / 2min avec 10% m/m de NaOH) jusqu'à la conversion finale en éthanol.....	27
Figure 4.12 Longueur, diamètre et ratio L/D des fibres de cellulose de <i>Salix miyabeana</i> en fonction du facteur de sévérité [Diop et al., 2015].....	28
Figure 4.13 Lignocelluloses de <i>Salix miyabeana</i> produites à des températures de vapocraquage entre 190°C et 220°C pour un temps de cuisson de 3 min	29
Figure 4.14 Effet du temps de résidence de 3 min (A) et 15 min (B) sur l'allure générale des fibres de lignocellulose suivant un traitement à 190°C avec une imprégnation de 1% H_2SO_4	29
Figure 4.15 Solution exempte d'algues après filtration sur 20 g sec de cellulose d'une solution de 35 g/L.....	33
Figure 4.16 Filtres de cellulose après filtration d'une solution d'algues de 20 g (A) et 11 g (B).....	33
Figure 4.17 Filtre de <i>Salix miyabeana</i> après la filtration complète de 9 g d'algues (<i>Scenedesmus</i> sp. AMDD) dans 100 ml d'une solution à 10 % m/m de NaOH.....	35
Figure 4.18 Cellulose de <i>Salix miyabeana</i> après filtration des algues avec 10% m/m de NaOH, après vapocraquage à 220 °C.....	37
Figure 4.19 Algues filtrées (11 g / 100 ml à 10% m/m de NaOH) sur 20 g de fibre de verre.....	37
Figure 4.20 Image au microscope inversé à épifluorescence Zeiss (Axio Observer D1) des microalgues après vapocraquage sans imprégnation au NaOH (220 °C / 3 min) (630x).....	39
Figure 4.21 Fermentation par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de 5 g de cellulose additionnée de 0,2% m/m d'urée après une saccharification (ASTM D5896-96) dans un volume 100 ml.....	41
Figure 4.22 Fermentation par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de 5 g de cellulose avec 1,3 g d'algues (b.s.) après une saccharification (ASTM D5896-96) dans un volume de 100 ml.....	41
Figure 4.23 Variation de la concentration en sucres et en éthanol lors de la fermentation par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de 12 g (b.s.) d'algues hydrolysées (ASTM D5896-96).....	42

Figure 5.1 A) Schématisation des procédés de transformation de la lignocellulose initiale et B) procédé modifié avec l'ajout de la transformation des algues.....	46
Figure 5.2 Légende des différents écoulements dans le bilan de masse du procédé proposé.....	47
Figure 5.3 Recyclage des eaux du procédé pour une culture d'algues à 2 g/L avec hypothèse de recyclage des eaux de 50%.....	48
Figure 5.4 Pré-concentration par coagulation/floculation avec comme hypothèse une diminution de volume de 94%.....	49
Figure 5.5 Étape de récupération de l'eau de décantation par carbonation	49
Figure 5.6 Filtration de la solution concentrée d'algues à 33 g/L sur des fibres lignocellulosiques avec une perte de 58% de sucres et lipides.....	50
Figure 5.7 Étape de vapocraquage des algues suivie de la précipitation acide de la lignine avec une récupération de 42% de sucres et lipides.....	51
Figure 5.8 Étape de production de la lignocellulose et fermentation des sucres	51
Figure 5.9 Liste des hypothèses utilisées pour le bilan de masse.....	52

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1 Résultats de la filtration d'une solution d'algues de 2 g/L en variant le type de fibre, lignocellulosique et cellulosique, à partir de <i>Salix miyabeana</i> sans aucune pression de moulage	27
Tableau 4.2 Résultats de filtration d'une solution d'algues de 2 g/L sur lignocellulose de <i>Salix miyabeana</i> en variant la température de vapocraquage de 190°C à 220°C avec un temps de cuisson de 3 min	30
Tableau 4.3 Résultats de la filtration d'une solution d'algues de 2 g/L sur la lignocellulose de <i>Salix miyabeana</i> en variant la pression initiale sur les fibres moulées de 0 à 50 psi	30
Tableau 4.4 Résultats de la filtration d'une solution d'algues de 2g/L avec de la lignocellulose de <i>Salix miyabeana</i> en variant la masse de lignocellulose utilisée de 10 g à 30 g	31
Tableau 4.5 Résultats de la filtration avec de la cellulose de <i>Salix miyabeana</i> en variant la concentration d'algues de 2 g/L à 35 g/L	32
Tableau 4.6 Caractérisation telle que fournie par le CNRC de <i>Scenedesmus</i> sp. AMDD (sur base sèche)	33
Tableau 4.7 Composition des carbohydrates de <i>Scenedesmus</i> sp. AMDD obtenue par une dépolymérisation standard	34
Tableau 4.8 Perte de sucres au niveau de la filtration pour le blanc (10 % m/m de NaOH seulement et 20 g de lignocellulose) et pour une solution de 10% m/m de NaOH avec 7 g d'algues et 20 g de lignocellulose	35
Tableau 4.9 Sucres totaux identifiés après vapocraquage à 220 °C / 3 min d'algues et/ou lignocellulose avec et sans imprégnation 10% m/m de NaOH	36
Tableau 4.10 Résultats de filtration de 11 g d'algues et de vapocraquage à 220°C avec 10% m/m de NaOH sur une matrice de fibre de verre	38
Tableau 4.11 Résultats après vapocraquage à 220 °C de 11 g d'algues sur de la fibre de verre sans imprégnation au NaOH suivi d'une post-hydrolyse à 4% acide	38
Tableau 4.12 Extraction au dichlorométhane des eaux après vapocraquage à 210°C, sans imprégnation au NaOH, de 20 g et 14,5 g d'algues (b.s.)	40
Tableau 4.13 Rendement en sucres suite à l'hydrolyse de 0,22 g d'algue avec le protocole ASTM D5896-96 à 72 % H ₂ SO ₄ non-modifié	43
Tableau 4.14 Rendement en sucres suite à l'hydrolyse de 0,22 g d'algue avec le protocole à 72 % H ₂ SO ₄ modifié	43

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

Il existe plusieurs types de biocarburants qui sont généralement classés selon différentes filières en fonction de leur substrat. Les biocarburants de 1^{ère} génération sont produits à partir de cultures, dont une grande partie sont destinées traditionnellement à l'alimentation telles le maïs, la canne à sucre et le soja. Au Québec, Éthanol Greenfield (EGF) produit environ 165 millions de litres d'éthanol à partir du maïs, tandis que la consommation d'éthanol carburant au Québec s'élève à 430 millions de litres [Gouvernement du Québec, 2015]. EGF fournit donc 38,4% de l'éthanol carburant consommé au Québec. Le reste est importé de d'autres provinces ou des États-Unis. Le gouvernement québécois avait comme objectif d'ajouter 5 % d'éthanol dans l'essence d'ici 2012, ce qui fut atteint avec l'aide d'importation d'éthanol pour combler la demande locale [Gouvernement du Québec, 2014]. Une augmentation des quotas de production d'éthanol pourrait par contre entraîner une concurrence entre les biocarburants et ces produits de première nécessité, plaçant la filière de 1^{ère} génération dans une position délicate [MEDDE, 2014]. Les biocarburants dits de 2^e génération utilisent quant à eux de la biomasse carbonée non alimentaire telle les pailles, le bois, les déchets végétaux, voire même les résidus solides urbains. Il s'agit d'une filière qui pourrait se fonder sur de vastes volumes de matière première, mais qui est actuellement limitée par certains verrous technologiques [Lee et Lavoie, 2013]. Finalement, les biocarburants de 3^e génération sont généralement associés aux microalgues, qui utilisent l'énergie lumineuse et le CO₂ pour la synthèse de glucides et de lipides [Chen et *al.*, 2014]. Il s'agit dans ce cas d'organismes photosynthétiques. Les microalgues peuvent être transformées de différentes façons en vue d'être valorisées en biocarburants. Un exemple commun est les acides gras qui, une fois extraits des algues, doivent subir une transestérification afin de produire du biodiésel. Les sucres fermentescibles peuvent quant à eux servir à la production de bioéthanol. Dépendamment des métabolites produits par les algues cultivées, une de ces deux voies sera exploitée, mais quel que soit le produit à valeur ajoutée en découlant, l'extraction des métabolites demeure un enjeu essentiel et un verrou technologique associé aux algues.

Ces trois générations de biocarburants proviennent de sources énergétiques renouvelables et apportent, si économiquement rentables, une piste de solution aux combustibles fossiles. La demande pour ces biocarburants, stimulée par des mandats (au Canada et ses provinces) et ses subsides, dont les "Renewable Identification Numbers" (RINs) aux États-Unis, est en forte croissance à travers le monde depuis plusieurs années (voir Figure 1.1) et les projections indiquent que cette tendance continuera à augmenter [EPA, 2013].

Projection de consommation de biocarburants 2009-2022

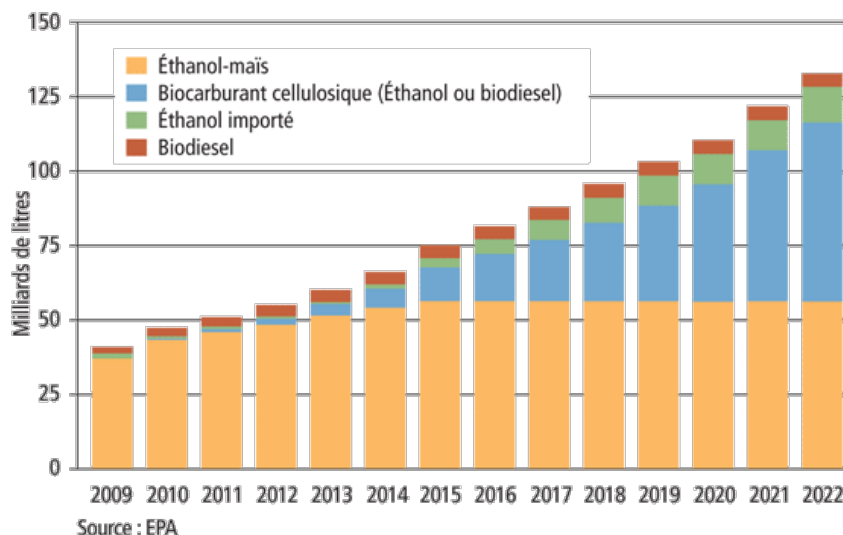


Figure 1.1 Projection de consommation de biocarburants 2009-2022 [EPA, 2013]

Comme le soulève la Commission sur les enjeux énergétiques du Québec, les technologies existantes de production de biocarburants de 2^e génération ne sont pas au point, ce qui ne les rend pas économiquement compétitives par rapport aux hydrocarbures fossiles [Gouvernement du Québec, 2014]. Afin de limiter la pression éthique sur les denrées alimentaires, le Gouvernement du Québec a décidé d'investir en recherche et développement pour la conversion de résidus carbonés non comestibles tels les résidus agricoles et forestiers [Gouvernement du Québec, 2014]. Par contre, la technologie pour la production de la 1^{re} génération de biocarburant est bien connue et est présentement utilisée dans le milieu industriel.

Tout comme la production de biocarburants de 2^e génération, un aspect critique freinant le développement à grande échelle de la production de biocarburants de 3^e génération est la rentabilité du procédé, elle-même influencée par les différentes étapes de culture, de séparation/concentration, d'extraction et de transformation des microalgues en intermédiaires utilisables. Pour rendre ces procédés rentables, il est généralement convenu que : (i) tous les intermédiaires doivent être valorisés; (ii) les eaux usées peuvent réduire l'apport externe en nutriments; et (iii) pour réduire les coûts, les étapes de séparation/concentration, d'extraction et de transformation en intermédiaires pourraient être faites de concert avec le co-traitement d'autre matières premières par voie d'opérations unitaires conjointes.

La production de biocarburants à partir de la biomasse microalgale repose sur cinq étapes distinctes :

- 1) la croissance des microalgues: étape biologique
- 2) la récupération: étape essentiellement mécanique
- 3) la conversion en intermédiaires : étape chimique

- 4) la valorisation des intermédiaires en produits finis
- 5) la gestion de l'eau et des résidus

Chacune de ces étapes comporte un certain nombre de verrous technologiques qui influencera le coût de production de biocarburants à partir de microalgues, rendant donc cette technologie difficile à appliquer à une échelle industrielle.

Le projet proposé vise à déterminer la faisabilité technique de l'intégration des microalgues dans un procédé de transformation de la biomasse lignocellulosique pour la production de biocarburants. La biomasse lignocellulosique, issue de résidus forestiers ou agricoles, est alors convertie simultanément (co-transformation) avec les microalgues, en biocarburants de 2^e et 3^e génération.

La production de microalgues permet de bioséquestrer le CO₂, notamment le CO₂ rejeté par l'industrie. Un élément important dans l'étape de croissance est la possible utilisation des eaux usées (municipales et industrielles) pour la croissance des microalgues, permettent de réduire la consommation d'eau fraîche en plus de représenter un apport en nutriments pour la croissance des microalgues. La charge polluante des eaux usées est aussi réduite par une synergie entre les microalgues (produisant de l'O₂) et les bactéries qui agissent comme un biotraitement sur l'effluent [Golueke *et al.*, 1957]. Ce point n'a pas été étudié dans ce travail mais constitue un objectif majeur pour tout travail sur la croissance des microalgues.

Les objectifs principaux pour ce projet sont les suivants :

- Optimiser la filtration de la biomasse microalgale en utilisant des fibres lignocellulosiques et celluloses en fonction de leurs paramètres physiques (longueur des fibres et porosité) et comprendre l'effet des fibres sur la filtration;
- Conversion simultanée des microalgues et de la lignocellulose avec le procédé de vapocraquage, en intermédiaires valorisables comportant une caractérisation de ces derniers.
- Hydrolyse simultanée des microalgues et de la cellulose pour la production de sucres et leur fermentation.

Les objectifs secondaires du projet de recherche sont les suivants :

- Atteindre un ratio de filtration de 1 g microalgue / g fibre
- Optimiser l'imprégnation (NaOH) de la matrice lignocellulosique et de la biomasse algale
- Faire le bilan de masse de la conversion des algues et des fibres

Ce projet permettra, si réussi et si les analyses techno-économiques sont favorables, de proposer une méthode qui pourra être mise à l'échelle pilote visant un procédé de conversion et transformation des microalgues en s'intégrant dans un procédé existant de conversion de biomasse forestière ou agricole qui est engagé dans une démonstration industrielle.

Ce rapport détaille les différentes méthodologies utilisées, les résultats obtenus, les recommandations et les conclusions importantes quant à la faisabilité de ce procédé à la jonction des biocarburants de 2^e et 3^e génération. Le tout débute par un état de l'art qui explique les différentes méthodes existantes quant à la concentration et transformation des microalgues, tant au niveau laboratoire qu'à plus grande échelle. Finalement, un bilan de masse est effectué pour chaque unité et la faisabilité économique est aussi abordée.

CHAPITRE 2 - État de l'art

2.1 Procédé de transformation des algues

2.1.1 Séparation et concentration

La séparation des algues de leur milieu de culture est une étape essentielle avant d'arriver à l'extraction des métabolites d'intérêts et ultimement à la production de biocarburants. Du point de vue économique, il s'agit d'une étape critique dans l'application d'un procédé de niveau industriel de transformation de microalgues. Elle est critique parce que la nature diluée des algues (jusqu'à 2 g/L) engendre un coût opérationnel élevé lors de la concentration, alourdissant le bilan économique de ces traitements [Uduman *et al.*, 2010]. Les microalgues ont besoin d'être concentrées le plus possible pour simplifier les futures étapes d'extraction et ainsi diminuer les coûts. Le choix de la méthode de récolte dépend de l'espèce de microalgues, des dimensions caractéristiques (diamètre équivalent) des particules et du produit final désiré. Les séquences de concentration utilisées dans l'industrie se classifient en 4 catégories, soit la récolte (0,5 % à 2 % masse sèche (MS), le reste étant de l'eau de culture), la concentration proprement dite (2,5 % à 3,5 % MS), la déshydratation (12 % à 35 % MS) et le séchage (85 % à 95 % MS), comme le montre la Figure 2.1 [Show *et al.*, 2013]. Les méthodes qui seront davantage abordées dans cette revue de littérature sont les plus fréquemment rencontrées lors de la concentration proprement dite dans les productions de microalgues à grande échelle, c'est-à-dire la coagulation/floculation, la centrifugation, la flottation et la filtration.

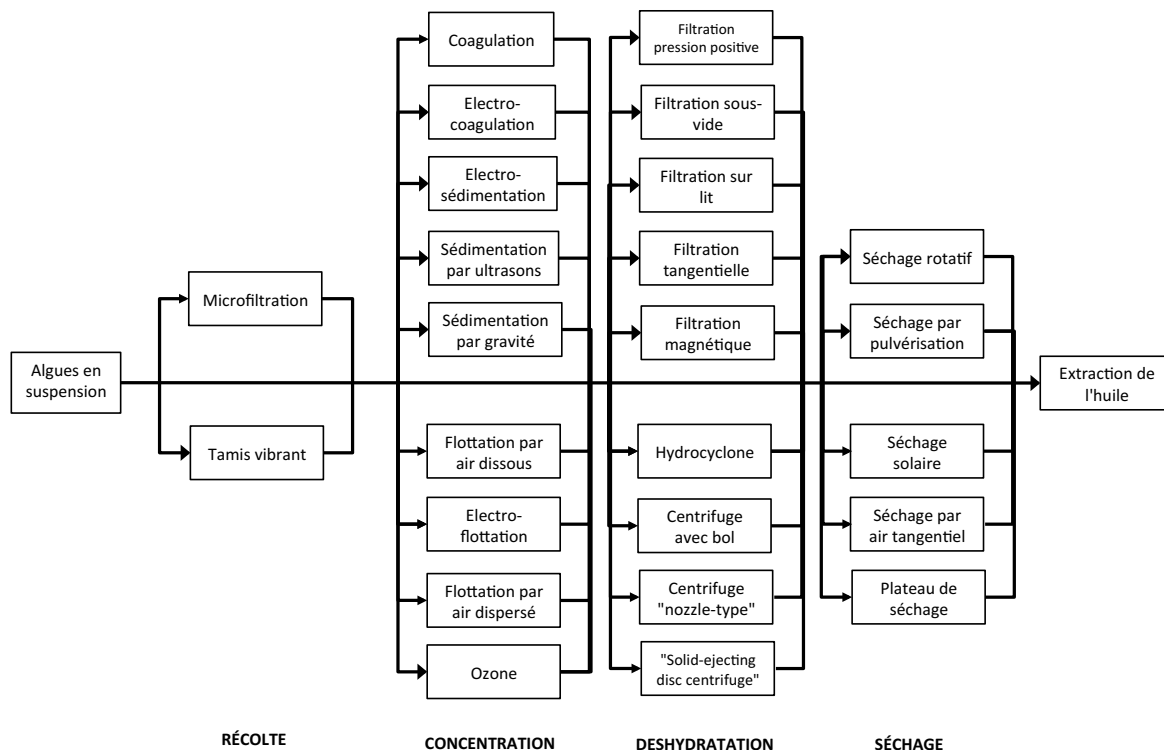


Figure 2.1 Principales méthodes de concentration des algues [adaptée de Show *et al.*, 2013]

2.1.1.1 Coagulation / flocculation

La coagulation/flocculation est un phénomène au cours duquel des particules en suspension dans un liquide s'agglomèrent pour en former de plus grosses. Ces nouvelles particules forment alors des agrégats (ou flocs). Ayant une masse supérieure aux particules indépendantes, elles sédimentent en principe plus vite. Cette agrégation peut être induite en modifiant la concentration ionique du milieu, permettant de supprimer les répulsions intercolloïdales (coagulation) et permet une agglomération des particules colloïdales (flocculation). Le pH est un facteur important lors du processus de coagulation et sédimentation permettant de modifier les charges des particules colloïdales. Initialement, les microalgues sont sous forme de suspension stable se repoussant dû aux charges négatives à leur surface [Vandamme *et al.*, 2012]. L'augmentation du pH accroît l'efficacité de la flocculation, causant la précipitation des coagulants (sels, ions métalliques) présents dans le milieu et pouvant aussi influencer la charge des microalgues [Wu *et al.*, 2012]. Les agrégats se forment via une interaction des charges négatives des microalgues avec les charges positives des coagulants. La plus grande densité des agrégats ainsi formés permet alors d'augmenter la vitesse de sédimentation.

2.1.1.2 Centrifugation

La centrifugation est un processus de séparation utilisant la force centrifuge pour séparer les particules solides d'un liquide. Cette séparation est basée sur la taille des particules et sur la différence de densité des composants. La centrifugation a démontré être une méthode de séparation pour les microalgues très efficace, mais le grand désavantage est le coût d'investissement initial et la grande demande énergétique. De plus, la grande force gravitationnelle et les forces de cisaillement peuvent endommager la structure des cellules et diminuer la viabilité et le rendement de récupération [Uduman *et al.*, 2010].

2.1.1.3 Flottation

La flottation est un phénomène de séparation par gravité, à l'inverse de la sédimentation, qui utilise des bulles ou microbulles, introduites dans la solution dans le bas du réservoir, pour aller chercher les particules solides. Ce principe dépend de deux probabilités: la probabilité de rencontre entre la bulle et la particule et la probabilité d'adhésion après la collision. Il est démontré que plus les particules solides sont petites, plus les probabilités de rencontre et d'adhésion diminuent [Uduman *et al.*, 2010]. Finalement, ces particules peuvent ensuite être retirées de la surface par décantation.

2.1.1.4 Filtration

La filtration implique le passage d'une solution contenant des particules solides à passer à travers un médium filtrant sous l'effet de la gravité, de la pression, du vide ou d'une force centrifuge. Le choix de la dimension des pores du filtre est fait en fonction de la dimension des particules qui doivent être retenues. Celle-ci sont alors retenues sur le filtre tandis que la

solution (filtrat) est récupérée, exempte de particules. L'avantage de la filtration est qu'elle peut même retenir les particules de très petite taille. Plus celles-ci s'accumulent à la surface, plus la résistance du liquide à passer au travers du filtre augmente pour une différence de pression d'opération constante. Une différence de pression doit être appliquée afin de forcer le liquide à traverser le filtre. Le plus grand désavantage de la filtration est le colmatage. Les pores se bouchent suite à une accumulation de particules, empêchant le liquide de traverser davantage. Pour pallier à ce problème, la filtration tangentielle peut être utilisée pour de grands volumes de culture. Cette méthode permet de limiter l'accumulation de particules par une circulation tangentielle du liquide à la surface de la membrane. Les particules restent alors dans le flux de circulation, tandis que le liquide peut traverser la membrane sous l'effet de la pression [Uduman *et al.*, 2010]. Il s'agit alors d'une méthode de concentration qui n'endommage pas les organismes, comme pourrait le faire la centrifugation, et n'est pas limitée par le volume à traiter comme la filtration membranaire [Petrusevski *et al.*, 1995].

2.1.2 Extraction

Une fois les algues concentrées, la prochaine étape est l'extraction, agissant souvent en tant que prétraitement de l'étape de conversion. L'objectif est de briser les membranes cellulaires en les altérant afin de libérer puis d'isoler les composés intracellulaires. Ces composés deviennent les intermédiaires primaires à partir desquels des intermédiaires secondaires seront obtenus qui seront ultimement valorisés en produits finis. Plusieurs méthodes existent pour l'extraction, généralement regroupées sous deux grandes familles: extractions mécaniques et non mécaniques (Figure 2.2).

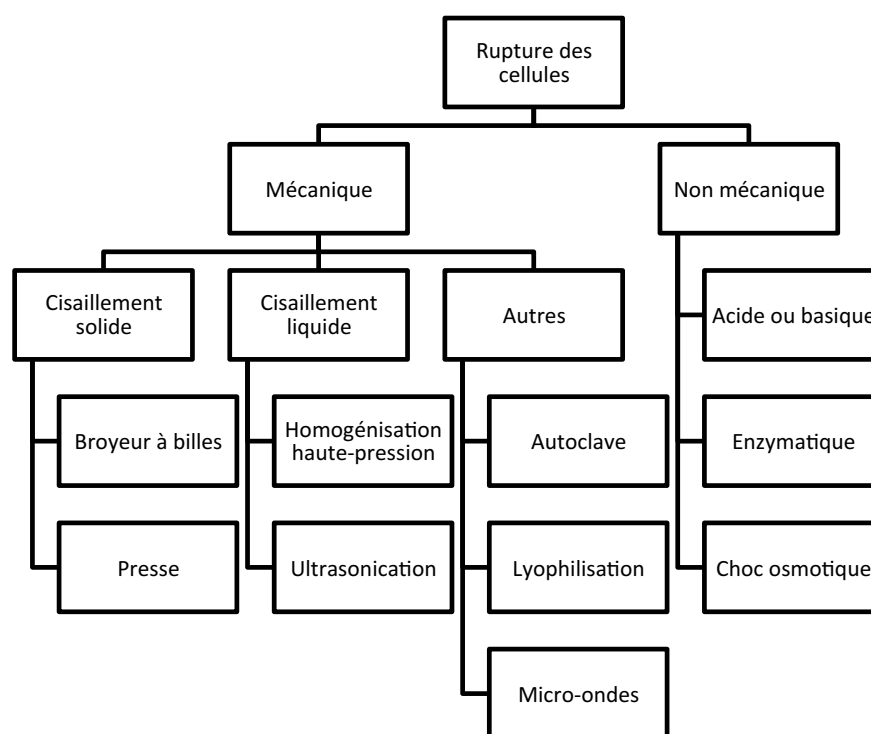


Figure 2.2 Différentes méthodes de rupture des algues [adaptée de Halim *et al.*, 2012]

2.1.2.1 Méthodes mécaniques

Parmi les méthodes d'extraction mécanique, notons celles avec cisaillement solide, incluant le broyeur à billes et la presse, et avec cisaillement liquide, incluant les ultrasons et l'homogénéisateur à haute pression [Chisti et Moo-Young, 1986].

Le broyeur à billes brise les cellules entre les surfaces solides en utilisant une agitation violente. C'est une technique applicable pour les productions à grande échelle due à son coût d'opération peu élevé [Chisti et Moo-Young, 1986]. L'utilisation d'ultrasons permet aussi le bris des cellules en suspension, se basant sur un phénomène de cavitation à haute fréquence. Lorsque les bulles de cavitation se brisent, elles libèrent une onde de choc violente, convertissant l'énergie sonore en énergie mécanique provoquant le bris des parois cellulaires [Chisti et Moo-Young, 1986]. L'homogénéisation à haute pression, quant à elle, fait passer la solution algale au travers d'une buse d'une chambre à haute pression vers une chambre à pression atmosphérique. Le bris des cellules est alors dû au changement brusque de pression [Halim *et al.*, 2012].

2.1.2.2 Méthodes non mécaniques

Quelques méthodes non mécaniques peuvent aussi être utilisées, comme les enzymes, le choc osmotique et la lyse chimique. Ces méthodes sont toutefois plus difficiles à appliquer à une échelle industrielle, principalement en raison de forts coûts opérationnels [Chisti et Moo-Young, 1986]. Par exemple, la lyse enzymatique est très efficace et très sélective pour la paroi cellulaire, par contre, le prix des enzymes limite un développement à grande échelle [Chisti et Moo-Young, 1986].

2.1.3 Conversion

Après les étapes de concentration et d'extraction, les composés d'intérêt contenus dans les microalgues peuvent subir une seconde transformation. À cet effet, plusieurs technologies sont actuellement disponibles. Ces dernières peuvent toutefois être séparées en 2 catégories: conversion thermochimique et conversion biologique. Les facteurs pouvant influencer le choix de la méthode de conversion impliquent le choix du produit final désiré, la quantité de biomasse, les coûts d'opération sans omettre certains critères spécifiques au projet [Brennan et Owende, 2010]. La Figure 2.3 présente les différentes technologies de conversion possibles.

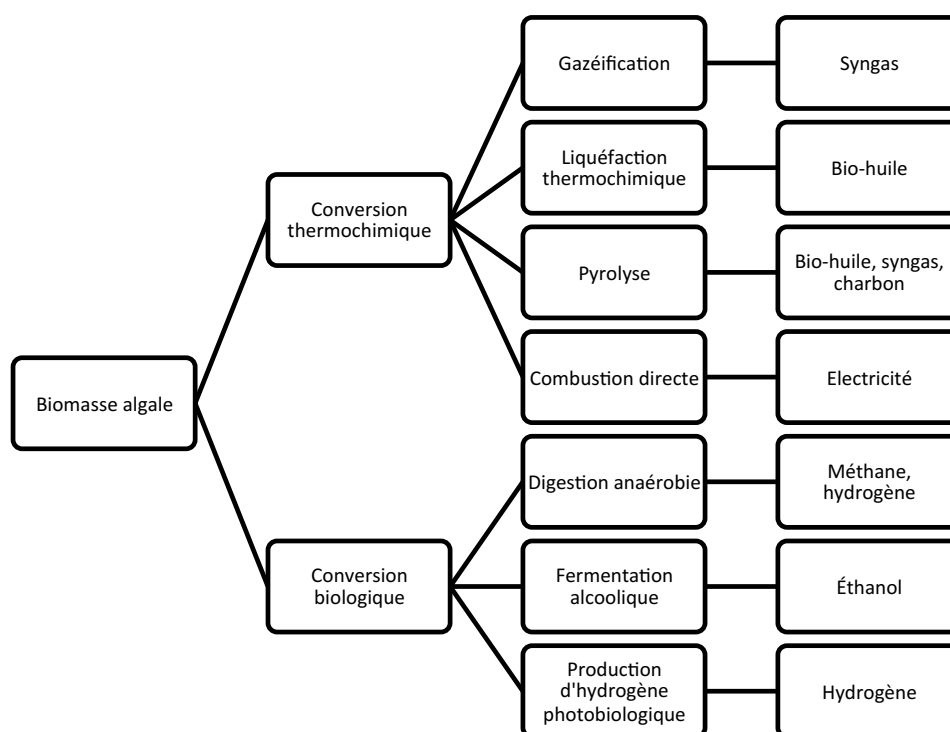


Figure 2.3 Technologies de conversion de la biomasse algale [adaptée de Brennan et Owende, 2010]

2.1.3.1 Conversion thermochimique

Ce type de conversion implique une décomposition thermique des composantes organiques de la biomasse. Celle-ci doit être pré-séchée à une faible teneur en humidité, typiquement 20% massique. La gazéification met en jeu l'oxydation partielle de la biomasse à haute température (entre 800 et 1000 °C) dans le but de former du syngas, un mélange de CO, H₂ et CO₂, généralement accompagné de produits secondaires comme le biocharbon, le goudron et les alcanes résiduels (tail gas). La liquéfaction thermochimique (qui peut s'effectuer sans séchage préalable) est un procédé à basse température et haute pression permettant de convertir la biomasse algale en biohuile sous l'effet d'un catalyseur. La pyrolyse convertit aussi la biomasse, essentiellement en bio-huile, produisant du syngas et du charbon à des températures allant de 350 °C à 700 °C en absence d'air. La combustion directe, quant à elle, oxyde la biomasse en présence d'O₂ en gaz chauds [Brennan et Owende, 2010].

2.1.3.2 Conversion biologique

Les conversions biologiques impliquent, entre autres, la digestion anaérobie, la fermentation, soit alcoolique ou lactique, et la production biologique d'hydrogène. La digestion anaérobie convertit la matière organique en biogaz, constitué principalement de CH₄ et de CO₂. Ce gaz peut ensuite être purifié et utilisé pour la production de chaleur, d'électricité ou être converti, sous l'effet de la pression et de la chaleur, en gaz naturel. La fermentation alcoolique utilise les sucres contenus dans la biomasse (comme les algues) pour être convertis en éthanol via une

métabolisation des glucides par les levures. Finalement, la production biologique d'hydrogène correspond à la production, sous certaines conditions, d'hydrogène par les algues en culture [Brennan et Owende, 2010]. Celles-ci passent alors de la production d'oxygène (photosynthèse) à la production d'hydrogène en privant le milieu de culture de soufre.

2.2 Principe du vapocraquage

Le développement à l'échelle industrielle de la production d'éthanol cellulosique repose en partie sur le fractionnement de la biomasse lignocellulosique. Lavoie *et al.*, (2011) fournissent une description historique du fractionnement. Parmi les nombreuses approches possibles permettant d'isoler les différentes fractions de la biomasse (lignine, hémicelluloses, cellulose, extractibles), les traitements à la vapeur (steam explosion) permettent d'isoler efficacement toutes les composantes. Le tout contraste avec les traitements papetiers Kraft où la lignine et les hémicelluloses sont souvent extraites conjointement. Le procédé implique, qu'initialement, la biomasse soit saturée avec un solvant (habituellement de l'eau) avec ajout d'un catalyseur homogène acide ou basique, au besoin, dépendamment de la macromolécule ciblée initialement. La saturation de la biomasse avec le solvant est un élément critique pour une bonne efficacité durant le vapocraquage, car il faut laisser le temps aux molécules d'eau d'entrer dans les pores par capillarité [Lavoie *et al.*, 2011]. Cette biomasse imprégnée est ensuite chauffée avec de la vapeur saturée dans un réacteur pressurisé durant un certain temps, après quoi le système est dépressurisé en passant par une buse de faible diamètre [Lavoie *et al.*, 2011]. L'eau contenue dans la biomasse se change alors rapidement en vapeur, par une décompression soudaine à pression atmosphérique, causant une déstructuration et une défibration [Lavoie *et al.*, 2010a]. Cette méthode permet de fractionner les fibres et de modifier les propriétés physiques (exemples : surface spécifique, rétention d'eau, coloration, taux de cristallinité de la fraction cellulosique, longueur des fibres) de plusieurs types de biomasses [Jacquet *et al.*, 2012]. Il a été aussi observé que le procédé de vapocraquage modifie les propriétés chimiques et mécaniques des fibres en fonction des conditions d'opération utilisées. L'utilisation de températures entre 190°C et 220°C amène une autoprotolyse de l'eau qui, au final, amène un plus grand potentiel hydrolytique [Lavoie et Beauchet, 2012]. Des traitements de vapocraquage d'une grande sévérité entraînent également une dégradation thermique des sucres [Jacquet *et al.*, 2012]. La relation entre ces paramètres a mené à l'élaboration d'une équation portant le nom de « facteur de sévérité », élaborée en fonction des équations 2.1 et 2.2 [Overend et Chornet, 1987]:

$$R_o = \int_0^{t[\text{min}]} \exp \left(\frac{\tau[^\circ\text{C}] - 100}{14.75} \right) \times dt \quad (2.1)$$

$$S_o = \log R_o \quad (2.2)$$

Où S_0 est le facteur de sévérité, T (°C) la température et t (min) le temps de cuisson. La valeur de 100°C est la température de référence assumant que l'effet hydrolytique de l'eau sur la biomasse cellulosique est négligeable en dessous de cette température [Diop *et al.*, 2015].

L'imprégnation avec catalyse acide ou basique peut aussi être considérée, principalement lorsque la dégradation d'une macromolécule est visée en particulier. Les acides ont un effet plus prononcé sur les glucides (hémicelluloses et moindrement la cellulose), tandis que les bases ont un effet plus significatif sur la lignine. La concentration de la catalyse basique a été rapportée comme ayant un impact direct sur l'extraction de lignine, pour des conditions identiques de temps et température [Lee *et al.*, 2014]. Une augmentation de la concentration entraîne une production de fibres cellulosiques plus blanches. Étant donné que l'hydroxyde de sodium a un effet direct sur l'extraction de la lignine, et possiblement sur l'hydrolyse des algues, il est alors possible de définir son effet sur le facteur de sévérité tel qu'indiqué dans l'équation 2.3 [Lee *et al.*, 2014]:

$$R_0 = \int_0^{t(\text{min})} \exp\left(\frac{T[^\circ\text{C}] - 100}{14.75}\right) \times dt \times \frac{C}{20} \quad (2.3)$$

Où C est la concentration molaire en hydroxyde dans la solution. La valeur de R_0 peut être utilisée pour calculer le facteur de sévérité défini par l'équation 2.2. La concentration en hydroxyde peut être calculée pour les expériences avec catalyse acide ou basique. Lorsque l'eau pure est utilisée, la concentration en hydroxyde est définie par l'équilibre d'auto-hydrolyse de l'eau ($K_w = 1 \times 10^{-7}$ M) [Lee *et al.*, 2014].

CHAPITRE 3 - Matériel et méthodes

3.1 Détermination de la concentration d'algues

La transmittance des échantillons, utilisée pour évaluer la concentration d'algues en solution, est déterminée par un spectrophotomètre UV-visible Cary 100 bio à une longueur d'onde de 685 nm utilisant une cuvette en quartz de 1 cm de largeur. La longueur d'onde d'opération a été déterminée par le maximum d'absorbance de *Scenedesmus* sp. AMDD à l'aide d'un scan entre 200 et 800 nm (présenté en Annexe 1).

Les standards ont été faits en utilisant une masse connue d'algues mise en suspension dans le solvant utilisé, l'eau. Les concentrations utilisées pour faire la courbe d'absorption se situent entre 0,02 et 2,5 g/L. Lorsque supérieure à 1 g/L, l'absorption atteint un plateau, ce qui indique que la concentration est trop élevée pour utiliser cette méthode. Les échantillons doivent donc être dilués jusqu'à une concentration maximale de 1 g/L pour avoir une lecture valable. Cette méthode respecte la loi de Beer-Lambert, qui affirme que l'absorbance d'une solution colorée est proportionnelle à la concentration de l'espèce responsable de sa couleur. La Figure 3.1 présente la courbe de calibration pour le dosage de la densité d'algues. La formule de calibration pour la concentration d'algue à 685 nm est présentée avec l'équation ci-dessous.

$$y = 3,2524x \quad (3.1)$$

où y = lecture à 685 nm

x = concentration de la solution d'algues (g/L)

L'interception avec l'axe des Y a été rapportée à 0, car l'absence d'algues ne doit pas en principe donner une valeur non nulle d'absorbance.

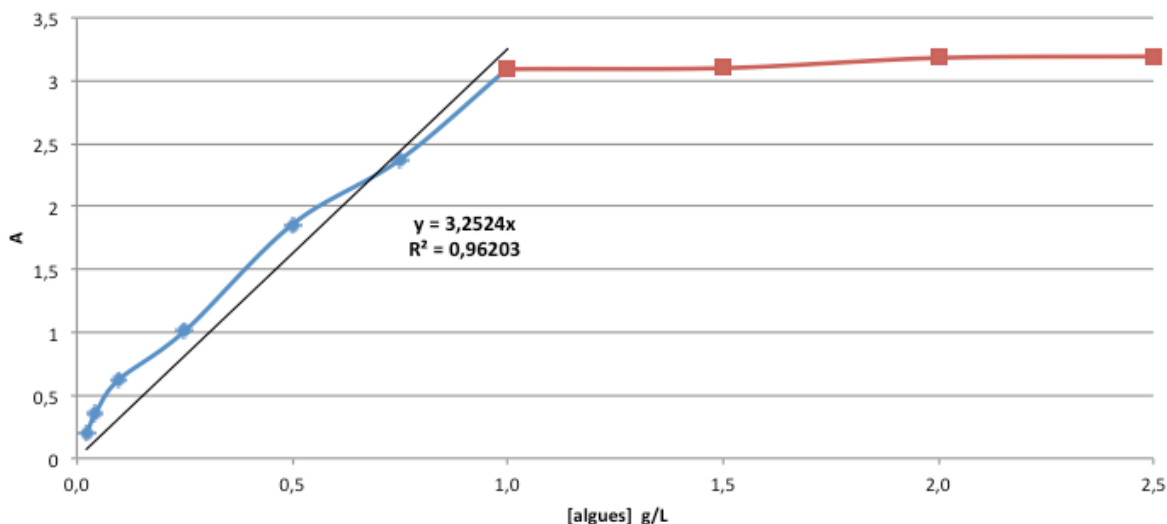


Figure 3.1 Courbe de calibration pour le dosage de *Scenedesmus* sp. AMDD par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 685 nm

3.2 Pré-concentration par coagulation/floculation

La coagulation permet de faire une pré-concentration des microalgues, diminuant ainsi le volume de culture à filtrer et qui pourrait contribuer à en recycler une fraction. La diminution du volume total entraînera nécessairement une diminution du temps de filtration ou, alternativement, la filtration de davantage de culture de microalgues.

Les microalgues utilisées pour ce projet sont *Scenedesmus* sp. AMDD, fournies par le Conseil national de recherches Canada (CNRC). Les microalgues du genre *Scenedesmus* mesurent de 3 à 78 μm de longueur et de 2 à 10 μm de diamètre [Guiry, 2015]. L'agrégation de ces particules permet donc également d'augmenter le diamètre moyen, facilitant ainsi la captation lors de la filtration.

Il a été démontré que la coagulation/floculation à haut pH est induite par la précipitation des sels de calcium et/ou magnésium. Il existe dans le milieu un équilibre entre les forces de répulsion électrostatique et les forces d'attraction de Van der Waals. Pour induire une coagulation (neutralisation des charges) et une floculation (agglomération des colloïdes), il faut modifier cet équilibre vers une dominance des forces d'attraction. En augmentant les charges positives du milieu, celles-ci neutralisent la charge négative des microalgues, donnée par les groupes fonctionnels associés à la paroi cellulaire, causant une déstabilisation et, par conséquent, une floculation [Vandamme *et al.*, 2012].

Par exemple, les travaux de Vandamme et al. démontrent qu'avant la floculation des algues, 97 % du magnésium et 41 % du calcium se retrouvaient dans la phase dissoute. Après floculation des algues (augmentation à un pH de 11), 41 % du magnésium et 6 % de calcium se retrouvaient encore dans cette phase. Cette diminution indique que ces deux cations participent au phénomène de floculation. Une plus grande concentration serait alors retrouvée dans la phase sédimentée après floculation des algues. De plus, le fait d'observer une plus faible concentration de calcium (41%) dans la phase dissoute avant l'étape de floculation indique, qu'au départ, une grande fraction du calcium est déjà dans la phase particulaire sous forme de carbonate de calcium. Cette précipitation est probablement due à la diminution du pH par le CO_2 dissout dans le milieu.

Quelques produits peuvent alors être choisis afin d'augmenter le pH et de fournir des cations manquant pour aider à faire flocculer les microalgues. La base nécessaire ne doit toutefois pas altérer la paroi cellulaire des algues pour ne pas relarguer prématurément des composés d'intérêt [Vandamme *et al.*, 2012]. Le $\text{Mg}(\text{OH})_2$ et le $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sont des exemples de base pouvant permettre la sédimentation. Par contre, $\text{Mg}(\text{OH})_2$ atteint seulement un pH de 9,6. Une base plus forte devrait être utilisée afin d'atteindre le pH nécessaire pour la floculation [Schlesinger *et al.*, 2012]. Le MgSO_4 et le CaCl_2 , initialement retrouvés dans le milieu de culture standard pour les algues (alors non toxique et nutritif), peuvent aussi agir comme agents coagulants sans toutefois affecter le pH.

Des coagulants et flocculants communs comme les sels d'aluminium ou le chitosane ne seront pas testés, connaissant déjà les problèmes de toxicité et de coût qu'ils pourraient engendrer [Schlesinger *et al.*, 2012]. Les coagulants toxiques sont inappropriés, car le milieu de culture

doit être recyclé et les algues seront possiblement fermentées; il faut donc éviter l'introduction d'inhibiteurs. Les flocculants comme le chitosane sont quant à eux très chers d'utilisation, pouvant faire grimper le coût de la floculation à 2,40 \$/kg algues. Une coagulation avec un mélange de $Mg(OH)_2$ ou $Ca(OH)_2$ peut quant à elle coûter en deçà de 1,00 \$/T algues [Schlesinger *et al.*, 2012].

L'hydroxyde de sodium peut également être utilisé afin d'augmenter le pH du milieu. Le NaOH est une base forte et très soluble dans l'eau (1110 g/L à 20°C) [Anachemia, 2013]. Par ailleurs, la quantité d'ions OH^- qu'il peut fournir dans la solution est très élevée. En plus d'augmenter le pH, l'hydroxyde de sodium peut agir sur les algues en gonflant la paroi cellulaire ou la membrane [Cormack et Somssich, 1997].

Après floculation, deux phases se distinguent, soit une phase claire et une phase particulaire. La phase claire (zone supérieure) contient une plus faible concentration d'algue. La phase particulaire (zone inférieure) est celle dans laquelle les algues ont sédimenté. Cette phase comporte alors les flocs d'algues ainsi que les différents précipités formés. Durant ce processus, afin de déterminer quels sont les meilleurs paramètres, deux critères importants sont à considérer, soit le temps et le taux de sédimentation (déterminer par la transmittance de la phase claire de l'échantillon). Une combinaison optimale de concentration de la base et du flocculant sera alors déterminée en identifiant l'échantillon qui aura une meilleure sédimentation, évaluée par la transmittance de la zone claire de la solution, combinée à de courts laps de temps.

Pour déterminer la vitesse de sédimentation, un échantillon de 1 ml de la phase claire sera prélevé après 0 min, 15 min et 20 h, à environ 1 cm de la surface, et analysé au spectrophotomètre. Plus les flocs formés seront d'une grande taille, plus la vitesse de sédimentation sera alors élevée. L'objectif est donc de trouver la meilleure combinaison entre la concentration base/coagulant afin de former les plus gros flocs. En résumé, plus les flocs sont denses, plus les algues en solution seront agglomérées, menant à une phase supérieure plus claire et à une sédimentation plus rapide.

3.3 Vapocraquage pour production de média filtrant

Le média filtrant ayant été sélectionné pour la concentration des microalgues est composé de lignocellulose ou de cellulose. La lignocellulose est obtenue par vapocraquage de biomasse lignocellulosique suivant une imprégnation préalable à l'eau durant 20 min. Après l'imprégnation, l'excès d'eau est enlevé à l'aide d'une presse sous une pression de 95 psi. La biomasse est ensuite transférée dans le réacteur de vapocraquage de 4,75 L. La température est ajustée par de la vapeur d'eau saturée opérée soit à 190 °C, 200 °C, 210 °C ou 220 °C. Une fois la température d'opération atteinte dans le réacteur, le milieu est maintenu sous pression pendant 3 min. Par la suite, la biomasse est rapidement transférée via la buse de la vanne pneumatique dans 5 L d'eau à pression atmosphérique. À cette étape, les hémicelluloses sont solubilisées dans l'eau. Le mélange est ensuite filtré afin de séparer les hémicelluloses de la lignocellulose. La masse solide, la lignocellulose, est ensuite lavée 3 fois au défibreux (ratio liquide/solide de 15) avec de l'eau à environ 60 °C pendant 15 min. Cette étape permet de

récupérer les hémicelluloses pouvant se retrouver sur les fibres. Finalement, la masse solide est filtrée puis pressée à 95 psi.

Pour la production de cellulose, la lignocellulose produite selon le protocole présenté ci-haut est imprégnée avec une solution 10 % m/m de NaOH à un ratio liquide/solide de 20 pendant 20 min. Le surplus de NaOH est ensuite enlevé par un pressage à 95 psi. La lignocellulose imprégnée est par la suite transférée dans le réacteur de vapocraquage à une température de 210 °C et un temps de résidence de 3 min [Lavoie *et al.*, 2010b]. La biomasse est ensuite vapocraquée dans 5 L d'eau. La lignine se retrouve alors solubilisée dans l'eau. Le mélange solide/liquide est filtré, lavé puis pressé de la même façon que la lignocellulose. La masse solide restante est à ce point essentiellement de la cellulose.

3.4 Filtration

3.4.1 Type de filtration

L'étape de filtration a pour but principal de concentrer davantage la solution d'algues afin de retirer un maximum d'eau du milieu, complétant ainsi l'étape de coagulation/floculation. Ce type de filtration peut s'effectuer avec pression négative (sous vide) ou pression positive. La différence majeure entre les 2 systèmes est la contrôlabilité et la gamme de pression utilisée. La presse disponible pour les essais se contrôle entre 0 et 95 psi et le système sous vide entre 0 et -14 psi (0 et -28,5 pouce de Hg). Pour les mêmes conditions de média filtrant (même masse, compaction et type de fibre), il sera ainsi possible de déterminer quel type de filtration est le plus adéquat pour l'utilisation désirée, tant du côté de la facilité du maintien de la pression ainsi que pour le volume total filtré.

3.4.2 Mise en forme du filtre

Pour fabriquer le filtre, une masse connue de biomasse (lignocellulose ou cellulose) est mélangée avec de l'eau chaude dans un défibreux (Standard Disintegrator Model 500-1, Labtech) afin de briser les agglomérations et homogénéiser les fibres, permettant ainsi la mise en forme (moulage) dans le réservoir de filtration. Le mélange est ensuite versé dans un réservoir de 1,7 L ayant un diamètre de 10 cm. L'eau s'écoule tranquillement par gravité et la biomasse se met en place dans le fond du réservoir. Si besoin, la presse peut être utilisée pour accélérer la séparation de l'eau et du solide. Il faut par contre éviter de créer des chemins préférentiels dès le départ, car l'application d'une pression pourrait déplacer la biomasse, nuisant ainsi à une bonne filtration.

Une fois l'eau de mise en forme écoulée, une pression positive peut finalement être appliquée afin de compacter le média filtrant, réduisant la taille des pores entre les fibres et permettant d'enlever l'excédent d'eau. La presse utilisée est présentée à la Figure 3.2. Se référer en Annexe 2 pour la procédure standardisée utilisée pour la mise en forme du filtre.



Figure 3.2 Presse utilisée (volume de 1,7 L) pour la mise en forme des filtres et pour effectuer les filtrations

Lorsque le filtre est en contact avec la solution d'algues, il se gonfle légèrement et perd une partie de sa forme compactée. Le fait de mettre une plaque métallique sur le filtre permet de garder une légère pression, diminuant le gonflement et offrant de meilleurs rendements de filtration. La Figure 3.3 montre un exemple de filtre une fois pressé. L'utilisation de la plaque entraîne toutefois une perte de masse algale parce qu'une partie des algues se retrouve collée au métal. Pour les essais, lorsque le filtre est destiné à un traitement de vapocraquage ou à une hydrolyse, la plaque de métal n'est pas utilisée durant la filtration afin d'éviter le plus possible les pertes d'algues. La plaque est alors utilisée seulement pour les tests de filtration afin d'être le plus reproductible possible. Le filtre formé a un diamètre de 10 cm.



Figure 3.3 Exemple de filtre de lignocellulose de *Salix miyabeana* produit à l'aide de la presse, compactée à 50 psi, et ayant un diamètre de 10 cm

3.4.3 Procédure de filtration

La solution algale est versée dans le réservoir contenant la biomasse de filtration (voir Figure 3.2). Si rien ne traverse le filtre par simple gravité, une pression (ou vide) est appliquée afin de forcer la filtration. Cette pression doit être ajustée graduellement, car une augmentation trop rapide pourrait diminuer drastiquement l'efficacité de filtration en faisant traverser les algues sans qu'elles soient captées par le filtre. Plus les algues sont retenues par le filtre, plus la résistance du liquide à le traverser augmente. Il faut alors augmenter la pression afin de continuer la filtration. Lorsque la pression n'arrive plus à maintenir la filtration, le filtre est complètement colmaté par les algues, représentant la limite supérieure d'algues pouvant être filtrées. La filtration peut aussi être arrêtée lorsque les algues commencent à traverser le filtre. Le débit est calculé à chaque changement de pression. Le liquide filtré est transféré dans un bécher puis pesé et le débit est par la suite calculé en fonction du temps de filtration.

3.5 Vapocraquage des algues

Pour traiter les algues par vapocraquage, il est essentiel d'avoir un média permettant de les supporter. Les algues sont sous une forme pâteuse et humide, ce qui les rend impossibles à manipuler seules. Dans le procédé proposé, les algues seront captées par les fibres lignocellulosiques, pour ensuite être traitées à la vapeur. Dans le réacteur de vapocraquage, les fibres empêchent les algues de coller et de sécher sur les parois. Par contre, ces fibres peuvent amener une variation dans les résultats, n'étant pas homogènes. Un blanc, fait seulement de fibres lignocellulosiques, est dans un premier temps vapocraqué seul en guise de référence. La différence entre l'échantillon et le blanc peut alors être associée à la présence d'algues.

L'efficacité de vapocraquage des algues est mesurée par la concentration en sucres du milieu, ainsi une plus grande concentration de sucres dans la solution aqueuse témoigne d'une solubilisation plus grande de la masse algale. La lignocellulose peut aussi générer une légère quantité de sucres résiduels provenant des polymères structuraux glucidiques. Normalement, ceux-ci sont retirés lors du premier vapocraquage, mais une certaine proportion va quand même être hydrolysée lors du second vapocraquage. De plus, la cellulose peut se solubiliser en partie si le facteur de sévérité utilisé est élevé. Ces sucres seront alors quantifiés par le vapocraquage du blanc.

Afin de bien quantifier les algues explosées, il faut utiliser une quantité de biomasse permettant de solubiliser suffisamment de sucres dans l'eau de vapocraquage (environ 6 L incluant l'eau de lavage), pour être détectables par HPLC. La limite de détection pour la méthode du HPLC (Agilent 1100 series) est de 10 ppm pour le glucose. Étant le sucre quantifiable en plus faible concentration dans les algues (caractérisation détaillée et expliquée à la section 4.4), il faudrait au moins 4 g d'algues sèches (18 g humides) pour obtenir 10 ppm dans l'eau de vapocraquage, avec une hypothèse de solubilisation des sucres algaux de 100 %. En tenant compte de la dépolymérisation à 4% m/m de H_2SO_4 (méthode NREL/TP-510-42623 présenté en Annexe 4), dans le but d'analyse au HPLC, il faut alors diluer au moins 5 fois l'échantillon pour ramener dans les critères de pH opérable de la colonne. Alors, l'utilisation

d'une plus grande masse d'algues (minimum 40 g supposant une efficacité de 50 % et une dilution de 5) est nécessaire pour une meilleure quantification.

Un des avantages du traitement simultané des fibres et des algues est lié à l'étape d'imprégnation avec 10 % m/m de NaOH permettant la délignification de la lignocellulose durant le second vapocraquage tout en affaiblissant la membrane des algues. Les algues sont alors mises en solution dans 100 ml (plus petit volume possible pour avoir une bonne filtration) de 10 % m/m de NaOH, mélangées et imprégnées 1 h, puis filtrées sur la lignocellulose. Ce mélange est ensuite transféré dans le réacteur puis exposé à 210°C avec une cuisson de 2 min [Lavoie *et al.*, 2010b]. La solution récupérée, un mélange de cellulose, lignine et d'algues explosées, est ensuite filtrée pour retirer la cellulose. Cette solution est filtrée une seconde fois sur un filtre 1,5 µm pour capter la fraction insoluble, incluant les algues et/ou fragments d'algues. La solution restante devrait donc contenir les sucres solubilisés et la lignine. Une dépolymérisation standard (méthode NREL/TP-510-42623) permet par la suite de dépolymériser les sucres tout en précipitant la lignine. Le liquide est analysé par HPLC. Connaissant la quantité théorique de sucre contenu dans les algues entières, un pourcentage d'efficacité peut être obtenu suite au dosage HPLC des sucres extraits.

3.6 Fermentation

Les algues captées sur la cellulose (à ne pas confondre avec la lignocellulose) par filtration sont converties en parallèle avec la cellulose par une hydrolyse, étape nécessaire afin de convertir les oligosaccharides en monosaccharides fermentescibles. En plus d'hydrolyser la cellulose, cette étape hydrolysera les algues, permettant d'utiliser les sucres algaux et les autres composés (comme les protéines), influençant ainsi le rendement de la fermentation. Le contenu protéinique des algues pourrait représenter une source d'azote essentielle autrement manquante dans les sucres cellulotiques. Afin de déterminer si les algues apportent réellement une plus-value à la fermentation, un mélange algues-cellulose et de la cellulose seule sont hydrolysés et comparés entre eux afin de voir le rendement global de fermentation. Le protocole utilisé pour l'hydrolyse de la cellulose est le protocole ASTM D5896-96 (présenté en Annexe 3).

Un échantillon d'algues seules (sans fibre de cellulose) sera finalement fermenté afin de voir si les algues sont une source fermentescible sans apport extérieur en nutriments. Ainsi, une quantité g éthanol / g algues pourra être établie, sans être influencée par les variations provenant de la cellulose. Un blanc, contenant seulement du glucose, servira de comparaison et sera composé d'une concentration initiale en sucre identique à celle des algues. Cette façon de faire permettra de voir si, dans les algues, il y a d'autres composés (comme des protéines) qui augmentent la production d'éthanol. Toutefois, le protocole d'hydrolyse utilisé ne sera pas le même que celui employé pour l'hydrolyse de la cellulose. Cette méthode nécessite l'utilisation de beaucoup d'acide et la solution finale doit être diluée pour ramener le pH à des conditions de fermentation. La faible concentration en sucres et le fort contenu en eau des algues demanderaient alors l'hydrolyse d'une trop grande masse d'algues. Les algues seront alors hydrolysées avec le protocole de dépolymérisation des sucres avec 4 % m/m H₂SO₄ (méthode NREL/TP-510-42623). L'échantillon de sucres est acidifié à 4% m/m H₂SO₄ puis mis dans

l'autoclave à 121°C durant 1h. Une fois la réaction terminée, les sucres sont alors dépolymérisés puis quantifiables au HPLC. Le protocole complet peut être vu à l'Annexe 4.

CHAPITRE 4 - Résultats

4.1 Type de filtration

La filtration est très sensible aux changements brusques de pression (soit positive ou négative). Ainsi, la pression doit être contrôlée avec précision et ne doit pas fluctuer trop brusquement, sans quoi le filtre pourrait perdre rapidement de son efficacité. Une pression initiale trop élevée (dépassant 14 psi) résulterait en une efficacité nulle, car le liquide serait poussé avec une force excessive au travers du filtre, créant des chemins préférentiels. La filtration demande alors l'utilisation d'une faible pression initiale suivie d'une augmentation très graduelle. Il est difficile de valider le volume total filtré par le système de pression positive, car dès qu'une pression était appliquée sur la filtration, les algues n'étaient plus captées. Par contre, le système sous vide semble plus adapté pour ce type de filtration, car la pression négative peut alors être ajustée à 0,5 pouce de Hg (0,25 psi) près, permettant un meilleur contrôle, contrairement à la presse où la pression s'ajuste par incrément de 5 psi environ. Pour la suite des tests, la filtration sous vide sera utilisée afin de fournir plus facilement des valeurs de pression précises, donc plus reproductibles et comparables d'un essai à l'autre.

4.2 Flocculation

Les paramètres devant être déterminés pour la flocculation sont la concentration et le type de base de Brönsted (source d'ion OH^-) et de sel cationique divalent utilisés. Le but est de trouver la combinaison fonctionnelle permettant d'obtenir une flocculation et une sédimentation rapide et efficace, sans besoin d'impliquer une grande quantité d'ions.

En raison de son utilisation pour la conversion de la lignocellulose, le NaOH a été testé comme source d'ions hydroxyde dans les solutions d'algues. La concentration a été variée de 0 mM à 1000 mM, accompagné de 10 mM MgSO_4 , afin de vérifier le potentiel de ce mélange pour la coagulation et la formation de floccs. L'objectif consiste donc à identifier à quelle concentration de NaOH la flocculation s'effectue le plus efficacement. La Figure 4.1 présente les échantillons avec différentes concentrations de NaOH à 3 temps différents tandis que la Figure 4.2 présente la variation de la transmittance en fonction des mêmes concentrations, après 15 min et 45 min. L'équation menant à la transmittance est indiquée à la Formule 4.1. Originellement (T_0), la transmittance est, ou est tout près, de 0%, c'est-à-dire qu'aucune ou très peu de lumière peut traverser l'échantillon, car toutes les algues sont encore en suspension. Une transmittance qui augmente indique que des algues ont sédimenté, jusqu'à une valeur maximale de 100%.

$$\%T = \%T_t - \%T_0 \quad (4.1)$$

où $\%T_t$ = %transmittance au temps t (15 min ou 45 min)

$\%T_0$ = %transmittance au temps 0 (initialement)

Initialement, toutes les solutions sont identiques, de coloration verte foncée. Après 15 min, une séparation de phase commence à être visible pour une concentration minimale de 200 mM de NaOH (voir l'encadré à la Figure 4.1). En laissant le mélange sédimenter pour une durée maximale de 20 h, il est possible d'observer que la phase claire (exempte de particules) devient de plus en plus verte au fur et à mesure que la concentration de NaOH augmente. Cette couleur verte ne semble toutefois pas témoigner de la présence d'algues dans la phase supérieure, car aucune petite particule n'est visible à l'oeil nu. Une confirmation de l'absence d'algues dans la partie surnageante est aussi observée au microscope (AmScope B120C-E). Une autre preuve attestant ceci est que si ces échantillons sont laissés pour sédimentation pendant plus d'une semaine, la couleur verte ne disparaît pas, un autre indice affirmant que ce ne sont pas des algues en suspension. Il pourrait toutefois s'agir de chlorophylle contenue dans les algues et qui aurait été extraite sous l'effet du NaOH. Si la chlorophylle est libérée, les composés d'intérêt comme les glucides ou les lipides pourraient aussi être solubilisés ou libres en solution. Le NaOH, à grande concentration, pourrait alors être destructif pour les algues, ce qui les ferait éclater. La Figure 4.3, qui présente une image microscopique sur plusieurs couches des microalgues, ne permet pas de confirmer une altération de la structure. La lyse alcaline est toutefois un procédé connu et utilisé par les biologistes moléculaires pour l'extraction de plasmides [Cormack et Somssich, 1997]. Cette méthode met généralement en contact les bactéries ou un fragment de plante avec une forte solution alcaline, composée d'un détergent et d'une base forte, qui brise la membrane cellulaire et entre en contact avec l'ADN pour la dénaturer.

Outre l'attaque possible de la paroi cellulaire des algues, la floculation semble avoir fonctionné. La hauteur de la phase particulaire (dans le bas) augmente avec la concentration de NaOH. La présence de $MgSO_4$ en solution entraîne la formation de Na_2SO_4 et de $Mg(OH)_2$ qui précipitent entraînant alors les algues avec eux. Pour les deux essais à plus faible concentration de NaOH, la phase particulaire ne semble pas se former, le pH étant trop faible pour le processus de formation de floes, ne pouvant ainsi promouvoir la précipitation de l'hydroxyde de magnésium [Schlesinger *et al.*, 2012]. $Mg(OH)_2$ a une grande surface d'adsorption et une charge superficielle positive, permettant d'attirer la charge négative naturelle des microalgues [Uduman *et al.*, 2010]. La présence de magnésium influe alors sur la densité des algues, provoquant leur sédimentation.

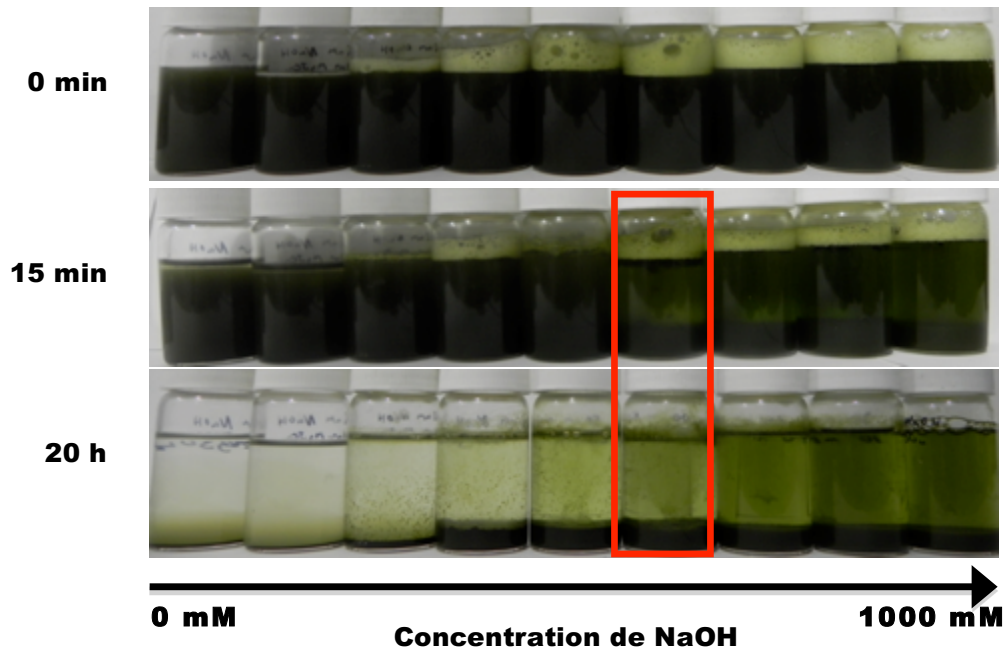


Figure 4.1 Variation de la concentration de NaOH en fonction du temps de sédimentation de *Scenedesmus* sp. AMDD à 2g/L avec une concentration de 10 mM de MgSO_4

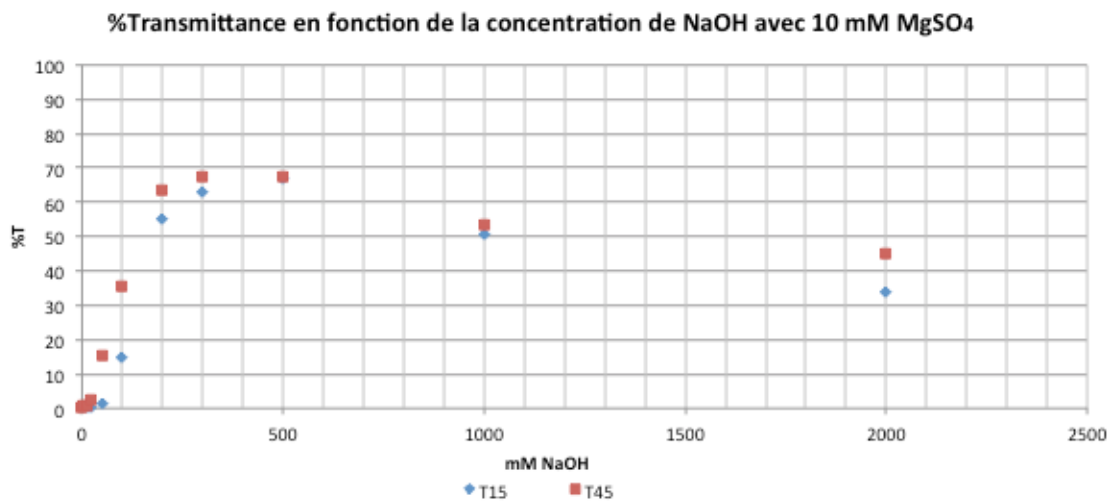


Figure 4.2 Variation de la transmittance en fonction de la concentration de NaOH après 15 min et 45 min de sédimentation avec *Scenedesmus* sp. AMDD à 2 g/L et 10 mM MgSO_4

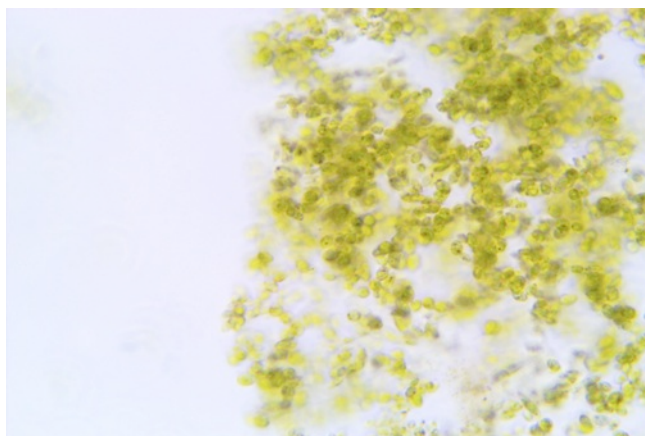


Figure 4.3 Photo au microscope (AmScope B120C-E) de *Scenedesmus* sp. AMDD après sédimentation avec 10% m/m NaOH et 10 mM H₂SO₄ (400x)

Des essais impliquant l'hydroxyde de calcium comme autre source d'ions OH⁻ ont aussi été effectués. Pour ces essais, la concentration de la base (Ca(OH)₂) a été variée de 0 mM jusqu'à saturation (23 mM) avec un apport constant de 10 mM de MgSO₄ (Figure 4.4). L'ajout seul de MgSO₄ ne peut induire la floculation, car le sel ne génère pas un milieu basique nécessaire à la floculation comme le démontre la Figure 4.4. L'augmentation de la concentration de Ca(OH)₂ semble par contre induire une floculation. Les paramètres optimaux sont difficiles à déterminer, car des concentrations de 5, 8, 12 et 23 mM produisent pratiquement les mêmes résultats. La Figure 4.5 semble toutefois indiquer que c'est à concentration de saturation que la sédimentation est la plus rapide. De plus, il est plus facile de travailler avec une solution à saturation (moins de manipulations, ajustement dans un système continu à l'aide de pastilles), mais cela peut impliquer plus de réactifs, influençant donc directement le bilan économique.

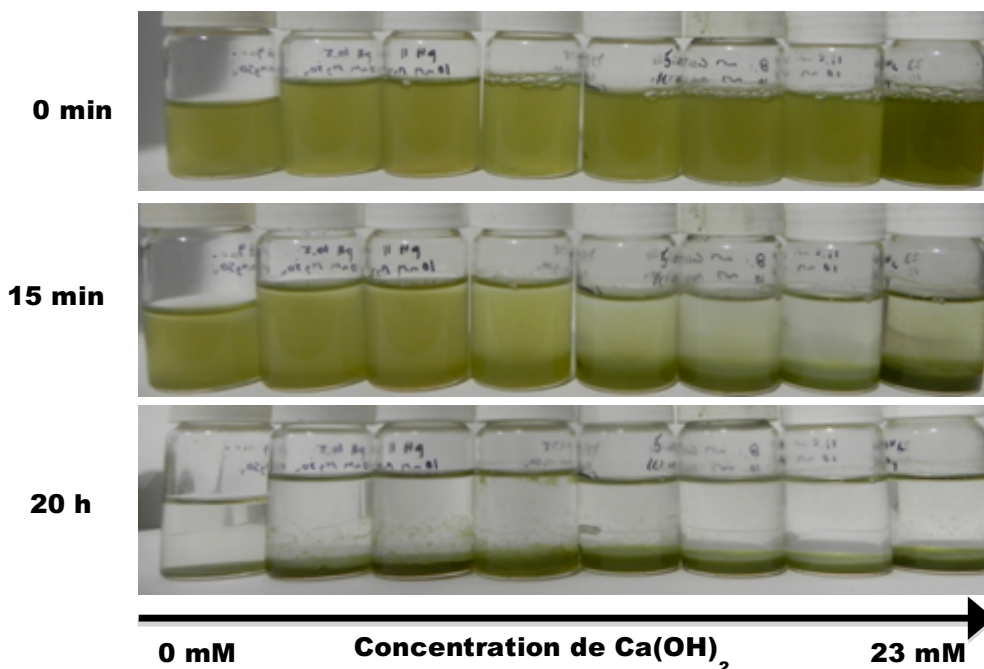


Figure 4.4 Variation de la concentration de Ca(OH)_2 en fonction du temps de sédimentation de *Scenedesmus* sp. AMDD à 1 g/L avec une concentration de 10 mM de MgSO_4

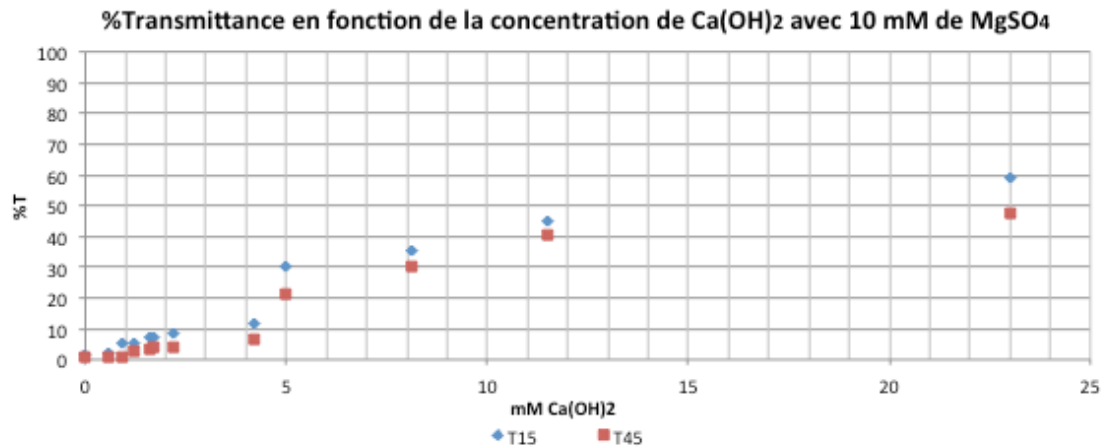


Figure 4.5 Variation de la transmittance en fonction de la concentration de Ca(OH)_2 après 15 min et 45 min de sédimentation avec *Scenedesmus* sp. AMDD à 1 g/L et 10 mM de MgSO_4

Des tests de précipitation, avec variation de la source de magnésium en milieu saturé de Ca(OH)_2 , ont été effectués en ajoutant du MgSO_4 , contrairement à Mg(OH)_2 qui est très peu soluble (Figure 4.6 et Figure 4.7). Pour le premier échantillon, décanté pendant 20 h, aucun floc ne semble avoir été produit avec 0 mM de MgSO_4 car, comparativement aux échantillons avec une plus grande concentration de MgSO_4 , l'épaisseur de la phase particulaire est très petite. Ceci indique donc qu'un milieu basique impliquant seulement du Ca(OH)_2 ne serait pas suffisant pour induire la floculation. En augmentant la concentration de MgSO_4 , la phase sédimentée commence à apparaître. La concentration entraînant une sédimentation plus rapide est observable dans l'encadré, soit une concentration de 10 mM. Au-delà de cette concentration de MgSO_4 , l'efficacité de floculation semble diminuer. En ajoutant plus de MgSO_4 , la dominance des forces de répulsion refait surface, impliquant un excès d'adsorption de cations par les algues [Dishon *et al.*, 2009].

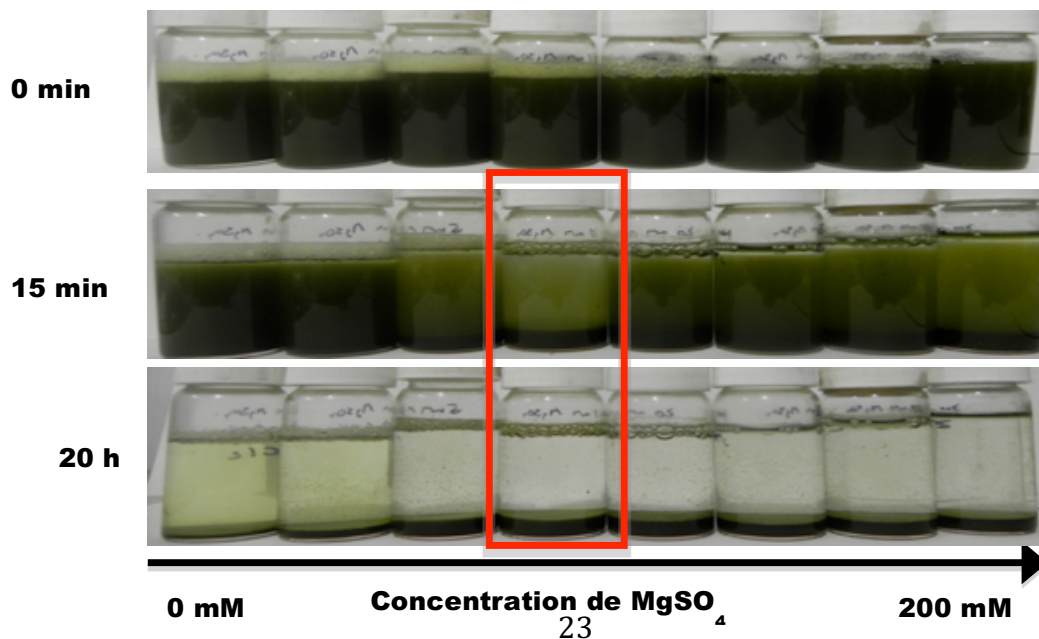


Figure 4.6 Variation de la concentration de MgSO_4 en fonction du temps de sédimentation de *Scenedesmus* sp. AMDD à 2 g/L avec une concentration de 23 mM de $\text{Ca}(\text{OH})_2$

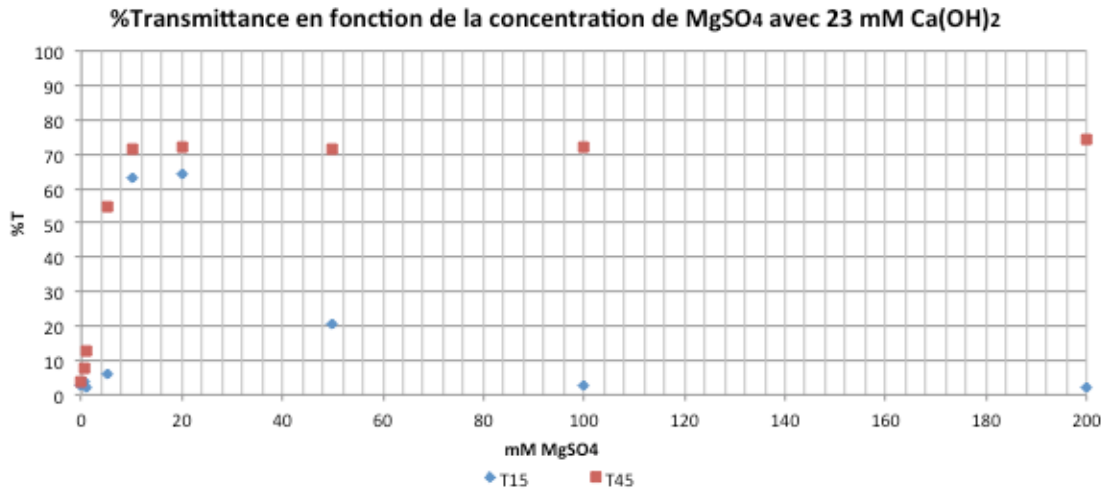


Figure 4.7 Variation de la transmittance en fonction de la concentration de MgSO_4 après 15 min et 45 min de sédimentation avec *Scenedesmus* sp. AMDD à 2 g/L et 23 mM de $\text{Ca}(\text{OH})_2$

La Figure 4.8 montre des images, prises à l'aide d'un microscope, des suspensions de microalgues avec les paramètres optimaux de floculation (23 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2$ et 10 mM MgSO_4). Dans la phase supérieure (Figure 4.8 A), quelques microalgues sont encore visibles et ne semblent pas s'agglomérer en flocs. La Figure 4.8 B, quant à elle, montre la grande concentration d'algues dans la phase sédimentée. Des algues non agglomérées sont toujours visibles (particules indépendantes), mais comme la Figure 4.8 B est une photo d'une couche seulement, des flocs peuvent s'être créés entre les différentes couches, sans être visibles à cause du focus. La meilleure combinaison observée implique toutefois du sulfate de magnésium (10 mM) et de l'hydroxyde de calcium (23 mM).

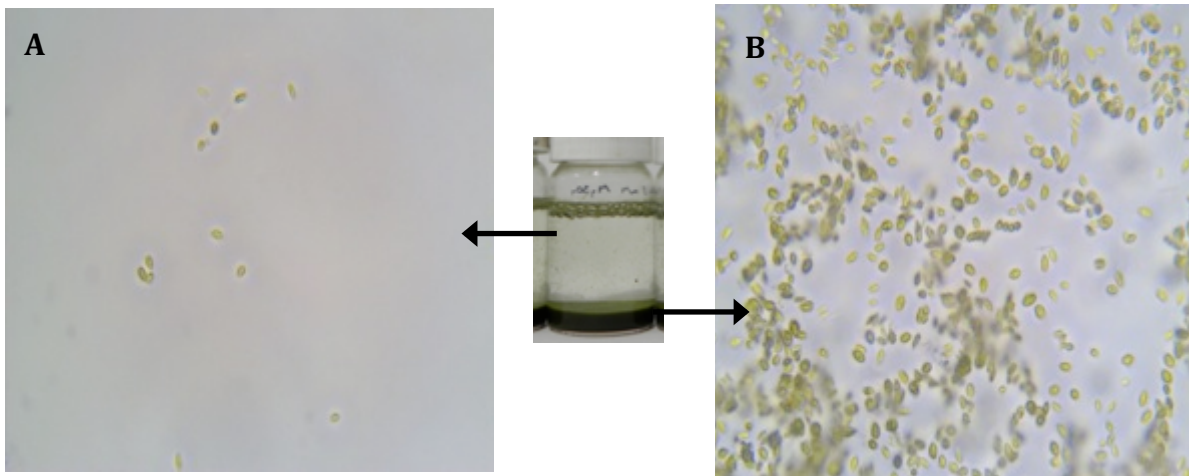


Figure 4.8 Photos au microscope (AmScope B120C-E) des microalgues après traitement avec 23 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2$ et 10 mM MgSO_4 . A) Microalgues dans la phase non précipitée après 24 h (400x) et B) sédimentées (400x)

Des tests impliquant de plus grands volumes ont été faits pour confirmer l'efficacité de la floculation à une échelle un peu plus grande, en utilisant les paramètres optimaux déterminés précédemment. Cette démarche a permis d'observer d'autres problématiques en lien avec cette opération. Pour bien mélanger et mettre en contact les sels et les algues et favoriser la formation de floccs, l'agitation a été faite à la main pendant 30 secondes violemment et 2 minutes lentement [MRWA, 2003]. À l'échelle du laboratoire, les petits volumes facilitent l'agitation et les contacts entre les particules. Toutefois, plus le volume augmente, plus l'agitation (en brassant le contenant) devient difficile et moins efficace. Ainsi, pour le même type d'agitation, les bouteilles de 1 à 5 de la Figure 4.9 semblent démontrer une baisse d'efficacité de la floculation. La bouteille 6 (1 L), a été agitée différemment des autres, en employant un défibreux (Standard Disintegrator Model 500-1, Labtech) au lieu de les agiter manuellement. Le défibreux offre une agitation mécanique violente, et l'agitation plus lente (2 min) est par la suite terminée à la main. Dans ces conditions, l'efficacité devient très semblable à celle retrouvée dans le petit volume (20 ml) de la bouteille 1. L'agitation est donc un paramètre non négligeable devant être considéré lors de la mise à l'échelle, car il peut s'avérer aussi critique pour le processus de floculation. Dans la bouteille 6, la phase supérieure a été aspirée sous vide, permettant de diminuer le volume de 94 % et d'augmenter la concentration d'algue de 2 g/L à 32 g/L avec un temps de sédimentation de 24 h.

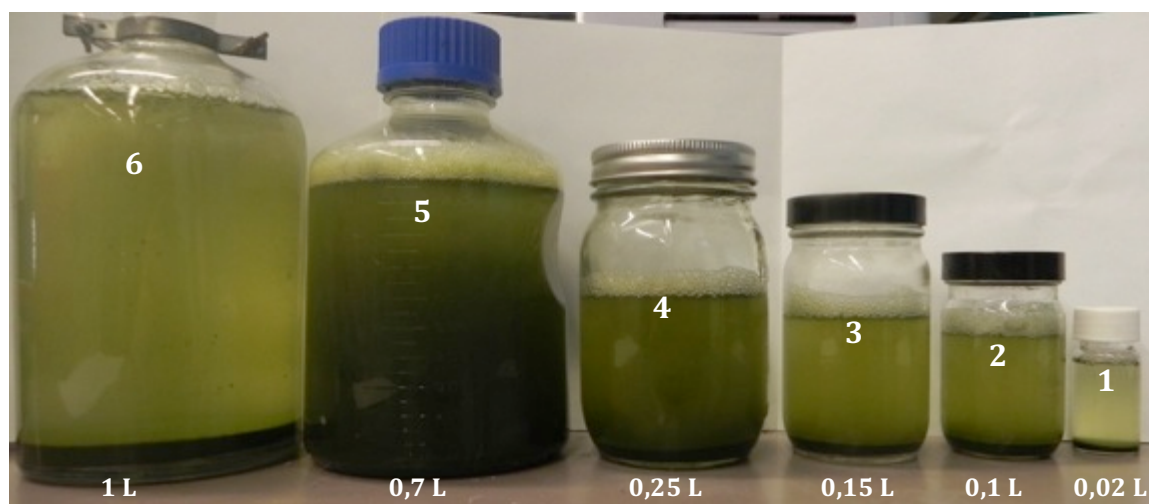


Figure 4.9 Test de mise à l'échelle pour l'efficacité de la floculation de *Scenedesmus* sp. AMDD avec des solutions d'algues de 2 g/L dans 23 mM de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ et 10 mM MgSO_4

4.3 Filtration

Plusieurs paramètres peuvent influencer l'efficacité de la filtration:

- la dimension des fibres (dépendant du facteur de sévérité du vapocraquage)
- la pression initiale sur les filtres (compaction des fibres)
- le type de fibre (lignocellulose ou cellulose)
- la masse de média filtrant
- la concentration de la suspension d'algues

La variation de tous ces paramètres a permis de déterminer quelle était la meilleure combinaison permettant une filtration optimale tout en générant les débits de filtration les plus rapides. Au sein du genre *Scenedesmus*, les microalgues mesurent de 3 à 78 μm de longueur et 2 à 10 μm de diamètre [M.D. Guiry, 2015]. Une observation au microscope a permis d'observer une longueur variant entre 5 et 8 μm pour les microalgues *Scenedesmus* sp. AMDD utilisées dans le cadre de ce projet. Cette sous-espèce, selon les observations faites au microscope, fait donc partie des plus petites pour ce genre. La filtration de ce type d'algue représente donc un défi de taille pour un éventuel procédé si l'on prend en compte que les algues en général seront de dimensions égales ou supérieures. La Figure 4.10 présente une image au microscope de *Scenedesmus* sp. AMDD.

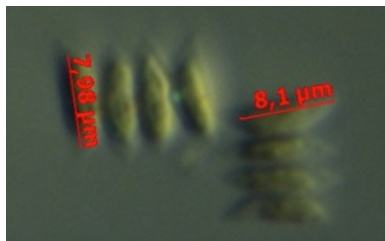


Figure 4.10 *Scenedesmus* sp. AMDD, envoyée par le CNRC, observée au microscope inversé à épifluorescence Zeiss (Axio Observer D1) (630x)

La filtration sur la lignocellulose implique également l'ajout de 10% m/m de NaOH dans la solution d'algue afin d'imprégner en même temps la lignocellulose de soude pour ainsi plus facilement délignifier lors du vapocraquage. Par contre, la filtration avec de telles solutions alcalines ne permet pas de voir les algues traverser le filtre, car la lignine extraite donne une couleur noire à la solution. Les essais de filtration sur la lignocellulose devront donc être faits sans ajout de NaOH.

4.3.1 Type de fibres

Les filtres utilisés sont composés de lignocellulose ou de cellulose. La cellulose implique des fibres significativement plus petites (de 0,18 à 0,27 mm) et homogènes par rapport à la lignocellulose (de 0,1 à 2 cm). Les fibres de cellulose forment davantage de petits feuillets où

les fibres sont très difficiles à isoler. Peu importe la lignocellulose utilisée (produite aux différentes températures) pour fabriquer la cellulose, celle-ci semble toujours avoir la même qualité. La Figure 4.11 présente le procédé utilisé pour la production de lignocellulose et de cellulose.

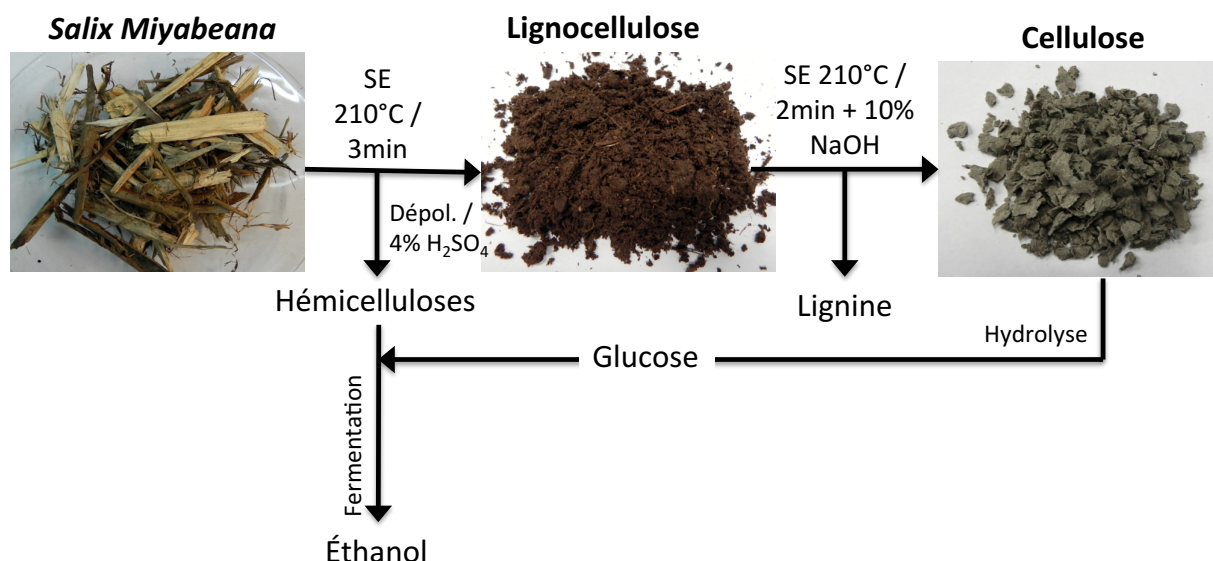


Figure 4.11 Procédé utilisé pour la production des fibres lignocelluloses (210°C / 3 min) et des fibres cellulosiques (210°C / 2min avec 10% m/m de NaOH) jusqu'à la conversion finale en éthanol

La cellulose s'est démontrée être un meilleur agent filtrant lorsque évaluée selon les mêmes paramètres que la lignocellulose. Cette amélioration est possiblement liée à la très petite taille des fibres en comparaison avec la lignocellulose. Les résultats de la filtration pour ces fibres sont comparés à ceux de la lignocellulose au Tableau 4.1 ci-dessous. Il est à noter que la cellulose utilisée pour la filtration a été produite à partir de la même lignocellulose utilisée pour cette comparaison.

Tableau 4.1 Résultats de la filtration d'une solution d'algues de 2 g/L en variant le type de fibre, lignocellulosique ou cellulosique, à partir de *Salix miyabeana* sans aucune pression de moulage

Effet du type de fibre sur la filtration d'une solution de 2 g/L d'algues						
Type de fibre	Masse (g sec)	Pression (psi)	Volume (L)	Débit moyen (ml/min)	g algue / g fibres	Écart type
Lignocellulose	20	0	0,23	46	0,015	0,0069
Cellulose	20	0	1,26	16	0,151	0,0265

La cellulose peut filtrer des volumes de solution d'algues significativement plus grands que la lignocellulose. Dans les mêmes conditions, elle peut en capter jusqu'à 5 fois plus que les fibres lignocellulosiques. Par contre, la masse supérieure d'algues captées est obtenue aux dépens du débit de filtration. Il devient alors plus lent d'utiliser la cellulose, mais l'indice de filtration croît jusqu'à 0,151 g algue / g cellulose. La compaction initiale utilisée est de 0 psi, impliquant que

le filtre est moulé sans pression positive. Plus cette pression grimpera, plus le débit diminuera, sans toutefois augmenter le volume total filtré, tel qu'il sera mentionné dans la section 4.3.3. En utilisant la cellulose, il faut alors éviter de réduire la porosité du filtre, car la taille même des fibres amène une porosité déjà assez petite pour capter les algues.

Une visualisation graphique de la longueur des fibres de cellulose, de *Salix miyabeana*, est présentée à la Figure 4.12. La taille des fibres a été déterminée en utilisant un 'fibre quality analyzer' (Optest Hires model, Hawkesbury, Canada). Le facteur de sévérité de la cellulose utilisée pour les tests était de 3,8 (selon les équations 2.1 et 2.2), ce qui, selon la Figure 4.12, produirait une longueur de fibre moyenne de 0,16 mm. Contrairement aux fibres de cellulose, la détermination de la longueur des fibres de lignocellulose n'est pas possible par cette méthode, car les fibres sont trop grossières, vraisemblablement en raison de la présence abondante d'incuits et de lignine sur les fibres.

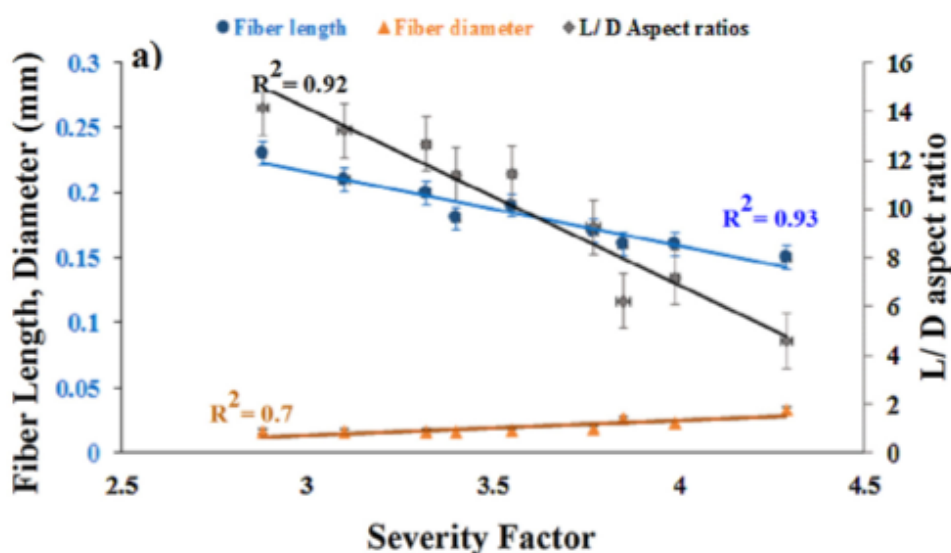


Figure 4.12 Longueur, diamètre et ratio L/D des fibres de cellulose de *Salix miyabeana* en fonction du facteur de sévérité [Diop *et al.*, 2015]

4.3.2 Dimension des fibres

La dimension des fibres produites par vapocraquage est directement reliée aux conditions ayant permis leur production, le tout lié au facteur de sévérité calculé à l'aide des équations 2.1 et 2.2. Les propriétés physiques des fibres sont importantes pour la filtration, car plus leur dimension (longueur, largeur) moyenne est petite, plus l'espace entre les fibres sera petit, ce qui devrait faciliter la captation des algues. À l'inverse, des fibres avec une dimension moyenne plus grande laisseront plus d'espace au liquide pour y circuler, résultant en une mauvaise rétention des algues sur la matrice lignocellulosique. La Figure 4.13 présente un exemple de fibres de lignocellulose obtenues à différents facteurs de sévérité (FS). Plus le facteur de sévérité est élevé, plus le défibrage est complet et moins il est possible d'observer des incuits (fibres non défibrées). Une plus grande température implique que la pression de vapeur utilisée sera plus élevée, permettant de défibrer davantage les fibres [Lavoie *et al.*, 2011].



Figure 4.13 Lignocelluloses de *Salix miyabeana* produites à des températures de vapocraquage entre 190°C et 220°C pour un temps de cuisson de 3 min

Le facteur de sévérité est aussi étroitement lié au temps de résidence dans le réacteur tel que démontre la Figure 4.14 ci-dessous.

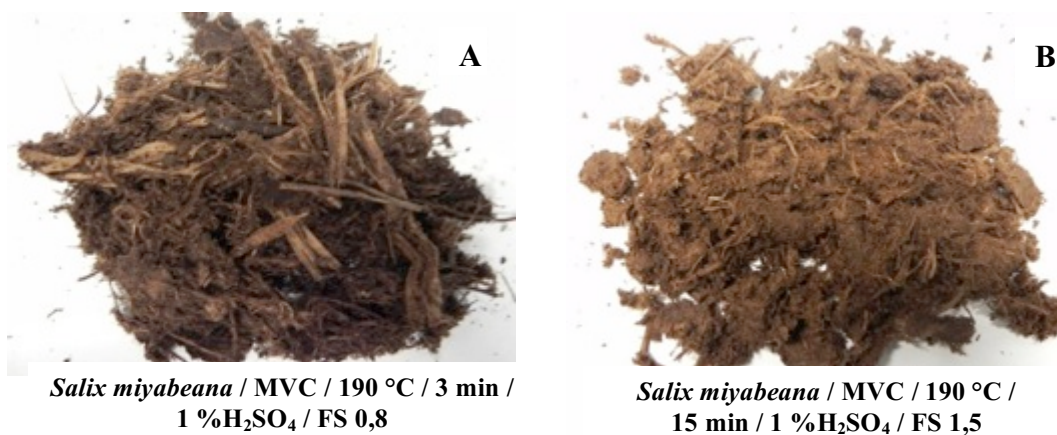


Figure 4.14 Effet d'un temps de résidence de 3 min (A) ou 15 min (B) sur l'allure générale des fibres de lignocellulose suivant un traitement à 190°C avec une imprégnation de 1% H₂SO₄

Plus le temps de résidence est élevé, plus la biomasse semble bien défibrée. La présence d'incuits n'est pas observée à 15 min de cuisson comparativement à 3 min. L'effet de la température des traitements à la vapeur sur les propriétés filtrantes de la lignocellulose produite est présenté au Tableau 4.2.

Tableau 4.2 Résultats de filtration d'une solution d'algues de 2 g/L sur lignocellulose de *Salix miyabeana* en variant la température de vapocraquage de 190°C à 220°C avec un temps de cuisson de 3 min

Effet du type de fibre sur la filtration d'une solution de 2 g/L d'algues						
Température SE (°C)	Masse (g sec)	Pression (psi)	Volume (L)	Débit moyen (ml/min)	g algue / g lignocellulose	Écart type
190	20	25	0,00	0	0,000	0,0000
200	20	25	0,00	0	0,000	0,0000
210	20	25	0,38	25	0,038	0,0070
220	20	25	0,51	21	0,048	0,0082

Avec les fibres plus grossières, par exemple celles produites à 190°C, le liquide ressort initialement complètement vert, indiquant une faible rétention des microalgues. Ces résultats montrent qu'il faut une taille minimale de fibre pour capter les algues, et celle-ci semble être obtenue à 210 °C (3^e ligne, Tableau 4.2). En deçà de cette taille, les algues ne sont pas du tout retenues sur la matrice filtrante. La porosité devient adéquate à partir de 210 °C, où la première filtration significative est observée. Pour un filtre fait avec des fibres produites à 220 °C, le volume filtré est plus grand que celui obtenu pour les filtres produits à plus basse température, générant un indice de filtration (g algue / g lignocellulose) plus élevé, pour un débit comparable.

4.3.3 Compaction initiale des fibres

Un autre paramètre pouvant changer la porosité des filtres est la pression à laquelle le filtre est compacté avant la filtration. Plus les fibres sont écrasées, plus la porosité diminuera, permettant ainsi de capter davantage les algues. La compaction peut aussi inhiber la filtration, car si le filtre est trop compacté, le liquide aura de la difficulté à le traverser, entraînant une bonne filtration, mais un temps de filtration très élevé. Le Tableau 4.3 présente les résultats de filtration à différentes pressions de moulage du filtre. Ces tests ont été effectués avec les fibres optimales déterminées en fonction du Tableau 4.2, soit celles obtenues à 220 °C, avec un facteur de sévérité de 4,0.

Tableau 4.3 Résultats de la filtration d'une solution d'algues de 2 g/L sur la lignocellulose de *Salix miyabeana* en variant la pression initiale sur les fibres moulées de 0 à 50 psi

Effet de la pression sur la filtration d'une solution de 2 g/L d'algues						
Facteur de sévérité	Masse (g sec)	Pression (psi)	Volume (L)	Débit moyen (ml/min)	g algue / g lignocellulose	Écart type
4,0	20	0	0,50	69	0,046	0,0117
4,0	20	25	0,30	16	0,026	0,0128
4,0	20	50	0,45	23	0,041	0,0081

Une des différences majeures observées au Tableau 4.3 concerne le débit de filtration. À l'inverse, l'absence de pression initiale pour le moulage des fibres permet à la solution de s'écouler plus rapidement, mais ce gain de débit s'obtient avec une perte d'efficacité. Pour l'essai avec 0 psi, le débit moyen est de 69 ml/min, l'efficacité de filtration de 99 % (déterminée par la méthode UV-Vis) et le volume total de la solution d'algues ayant pu être capté est de 0,5 L. Cette perte d'efficacité (1%) est très acceptable et le peu d'algues restant en solution peut servir d'inoculum pour une prochaine culture. Avec un moulage fait à pressions plus élevées, l'efficacité est de 100 % mais le filtre se colmate plus rapidement, diminuant le volume total filtré. Le colmatage peut être observé via l'augmentation du vide utilisé pour la filtration. Sans cette augmentation, la solution à filtrer ne pourrait plus s'écouler au travers des fibres (voir l'Annexe 5 présentant les graphiques des paramètres de filtration). Il est alors plus avantageux de ne pas compacter du tout les fibres avant la filtration, permettant ainsi d'augmenter le débit de filtration en impactant très peu l'efficacité.

4.3.4 Masse de média filtrant

La masse de biomasse utilisée pour la filtration peut aussi jouer un rôle important dans l'efficacité de cette dernière. Pour une même surface, plus la masse est grande, plus il y a de chance de capter les algues avant qu'elles ne traversent le filtre. Il faut donc trouver la masse optimale afin d'utiliser le minimum nécessaire pour la filtration. Le Tableau 4.4 montre l'effet de la variation de la masse de lignocellulose sur la capacité de filtration. Pour tous les essais, les fibres utilisées sont traitées par vapocraquage à 220°C, avec un facteur de sévérité de 4,0 et la pression initiale appliquée sur les fibres est de 25 psi.

Tableau 4.4 Résultats de la filtration d'une solution d'algues de 2g/L avec de la lignocellulose de *Salix miyabeana* en variant la masse de lignocellulose utilisée de 10 g à 30 g

Effet de la masse sur la filtration d'une solution de 2 g/L d'algues						
Facteur de sévérité	Masse (g sec)	Pression (psi)	Volume (L)	Débit moyen (ml/min)	g algue / g lignocellulose	Écart type
4,0	10	25	0,00	0	0,000	0,0000
4,0	15	25	0,27	13	0,037	0,0055
4,0	20	25	0,51	21	0,048	0,0082
4,0	30	25	0,38	16	0,024	0,0011

L'utilisation d'une masse de 10 g de lignocellulose (plus petite masse utilisée) a entraîné une faible rétention par les fibres, signifiant qu'une masse générant une épaisseur minimale, entre 0,5 et 1 cm, est nécessaire. Le plus grand volume de solution filtrée a été obtenu avec une masse de 20 g, générant un indice de filtration de 0,048 g algue / g lignocellulose. Les essais avec les grandes masses (20 g et 30 g) se terminaient en raison d'un colmatage du filtre, et avec les plus petites masses (10 g et 15 g), car la solution à la sortie devenait très verte. Le fait que le filtrat devienne vert indique que les algues ne sont pas captées en totalité parce que le liquide est maintenu à un vide trop grand ou qu'un chemin préférentiel s'est créé durant la filtration. La plus grande masse de fibre testée (30 g), donne une bonne efficacité de filtration, par contre, elle offre plus de restriction pour la filtration avec le vide. Une fois le volume maximal

filtré, plus aucun liquide ne traverse le filtre, même avec un vide maximal de -28,5 pouce de Hg. L'utilisation d'une trop grande masse a donné un effet négatif sur la filtration en offrant une plus grande restriction. Cet effet se traduit aussi par un débit de filtration plus faible. Ce test permet donc de conclure qu'une masse minimale est nécessaire par unité de surface et qu'une trop grande masse donne une grande restriction à la solution à filtrer, l'empêchant de s'écouler rapidement au travers des fibres. La grande variabilité entre les essais rendait toutefois difficile l'interprétation des résultats et l'identification des conditions optimales. Par exemple, l'écart-type des essais impliquant 20 g de fibre recoupe les essais avec 15 g. L'Annexe 6 présente les graphiques de filtration des essais en variant la masse de biomasse utilisée.

4.3.5 Concentration de la solution d'algues

La filtration, dans le procédé proposé, serait positionnée après l'étape de coagulation/floculation. Cette dernière augmente la concentration de la solution algale et l'effet de cette concentration sur la filtration a été testé en fonction des paramètres optimaux déterminés plus tôt. La cellulose, à faible masse par unité de surface et sans aucune pression de moulage, a été sélectionnée comme média filtrant. Les résultats de la filtration sont présentés au Tableau 4.5.

Tableau 4.5 Résultats de la filtration avec de la cellulose de *Salix miyabeana* en variant la concentration d'algues de 2 g/L à 35 g/L

Effet de la concentration d'algue sur la filtration de cellulose						
Concentration algues (g/L)	Masse (g sec)	Pression (psi)	Volume (L)	Débit moyen (ml/min)	g algue / g fibres	Écart type
2	20	0	1,16	15	0,132	0,0265
35	20	0	0,33	11	0,643	0,0116
35	11	0	0,21	10	0,659	0,0155

Une augmentation de concentration d'algue en solution entraîne une diminution significative du volume filtré en raison d'un colmatage très rapide du filtre. Par contre, l'efficacité de filtration est supérieure par rapport à tous les autres essais effectués. La Figure 4.15 montre la solution après la filtration sur la cellulose d'une solution de 35 g/L. Une observation de cette solution au microscope a permis de confirmer l'absence totale d'algues. Le temps total pour cette filtration est alors plus rapide qu'avec l'utilisation d'une concentration plus faible, le tout implique toutefois un débit légèrement inférieur. L'avantage de l'augmentation de la concentration se situe par rapport à l'indice $\text{g algue} / \text{g cellulose}$. Le volume filtré est donc diminué, mais la quantité d'algues captées est drastiquement augmentée en raison de la concentration originale plus grande d'algues en solution. Ces conditions entraînent une augmentation de l'indice de filtration de 0,13 à plus de 0,64 $\text{g algue} / \text{g cellulose}$. Afin d'augmenter davantage cet indice, la masse de cellulose a été diminuée en maintenant les autres conditions de filtration semblables. Par contre, l'indice de filtration est resté sensiblement le même, car le volume filtré a diminué, probablement dû à une saturation plus rapide. La Figure 4.16 présente les 2 filtres avec les différentes masses testées (11 g et 20 g). Ultimement, il semblerait donc que

l'indice de 0,65 g_{algue} / g_{cellulose} soit la valeur la plus élevée en tenant compte de tous les paramètres optimaux déterminés.



Figure 4.15 Solution exempte d'algues après filtration sur 20 g sec de cellulose d'une solution de 35 g/L

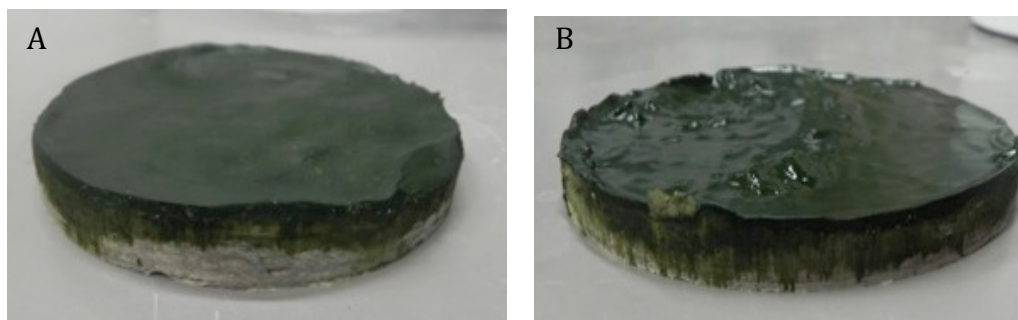


Figure 4.16 Filtres de cellulose après filtration d'une solution d'algues de 20 g (A) et de 11 g (B)

4.4 Détermination de la composition initiale des algues

La caractérisation des microalgues, faite par le CNRC, est présentée au Tableau 4.6. Les méthodes utilisées pour cette quantification sont, quant à elles, présentées en Annexe 7.

Tableau 4.6 Caractérisation telle que fournie par le CNRC de *Scenedesmus sp.* AMDD (sur base sèche)

Cendres	2,9 %
Azote	7,13 %
Lipides	29,8 %
Protéines	34,1 %
Carbohydrates	26,1 %

En effectuant une dépolymérisation standard (méthode NREL/TP-510-42623, normalement pour les hémicelluloses) sur les algues, les résultats ont rapporté une concentration massique en sucres quantifiables par le HPLC de 8,6 %, comparativement à 26,1 % selon la méthode phénol-sulfurique acide utilisée par le CNRC. Cette méthode implique une hydrolyse des liaisons glycosidiques des sucres complexes (polysaccharides), qui sont convertis en sucres simples (monosaccharides). La différence entre les taux de glucides obtenus par le CNRC et les résultats obtenus par la dépolymérisation standard pourrait être dus à la cellulose des algues. En effet, la dépolymérisation standard n'est pas assez sévère pour hydrolyser cette cellulose, ce qui pourrait expliquer cette différence de 17,5 % entre les 2 dosages. Dans les algues, la couche cellulosique se retrouve à l'intérieur et sépare les cellules individuelles. Elle représente également le constituant majeur de la paroi [Bisalputra et Weier, 1963]. Le Tableau 4.7 décompose le 26,1% de carbohydrates fournis par le CNRC en utilisant les résultats de dépolymérisation analysés par HPLC.

Tableau 4.7 Composition des carbohydrates de *Scenedesmus* sp. AMDD obtenue par une dépolymérisation standard

Carbohydrates	26,1 %
Glucose	1,7 %
Xylose (et autres sucres C5 ou C6)*	6,3 %
Autres	0,6 %
Cellulose	17,5 %

*Mannose, galactose, fructose (même temps de rétention)

4.5 Vapocraquage des algues

Lorsque la lignocellulose est utilisée comme filtre, donc préalablement au vapocraquage, les algues doivent d'abord être imprégnées avec 10 % m/m de NaOH puis filtrées. Ceci permet d'imprégner la lignocellulose entraînant une délignification en parallèle à la lyse des algues lors du vapocraquage. La Figure 4.17 présente une image du gâteau produit lors de cette filtration. La couche supérieure est formée de mousse, uniquement observable lors de la filtration avec NaOH. Cette mousse pourrait être expliquée par les propriétés fonctionnelles des protéines présentes dans les algues, laissant croire à une hydrolyse des parois cellulaires en milieu basique [Schwenzfeier *et al.*, 2013]. Ensuite, afin de retirer un maximum de NaOH, la filtration sous vide est maintenue à -28,5 pouce de Hg pendant environ 30 min. Après la filtration, la biomasse est défaite à la main en petits morceaux et introduite dans le réacteur de vapocraquage.



Figure 4.17 Filtre de *Salix miyabeana* après la filtration complète de 9 g d'algues (*Scenedesmus* sp. AMDD) dans 100 ml d'une solution à 10 % m/m de NaOH

De par la nature pâteuse et collante du filtre, la manipulation de ce dernier apporte beaucoup de pertes de biomasse algale. Le filtre doit également être brisé en plus petits morceaux afin d'optimiser le contact entre la lignocellulose et la vapeur. L'introduction du filtre dans le réacteur de vapocraquage dans son état compacté empêcherait la biomasse plus au centre (algues et lignocellulose) d'être chauffée puis vapocraquée de façon optimale.

Afin de compléter le bilan de sucres, les liquides après filtration et après vapocraquage ont été analysés. La filtration sur la lignocellulose donne un liquide noir (dû à la lignine) et contient vraisemblablement des sucres algaux (par l'hypothèse de la lyse alcaline). Pour obtenir seulement la fraction solubilisée, le liquide est filtré sur des filtres en fibre de verre avec des pores de 1,5 μm . Ainsi, les algues qui auraient pu traverser le filtre de lignocellulose, par une efficacité de captation moins bonne et non par une lyse alcaline, sont alors retirées. Les filtrats sont par la suite acidifiés pour induire la dépolymérisation des polysaccharides, puis analysés au HPLC.

En parallèle, un blanc composé seulement de 10 % m/m de NaOH est filtré de la même façon sur la lignocellulose, car elle peut être la source de sucres hémicellulosiques en raison d'un lavage insuffisant aux étapes de production de la lignocellulose. Les résultats des différentes filtrations de la solution d'algues (à 10% m/m de NaOH) et du blanc sont présentés au Tableau 4.8.

Tableau 4.8 Perte de sucres au niveau de la filtration pour le blanc (10 % m/m de NaOH seulement et 20 g de lignocellulose) et pour une solution de 10% m/m de NaOH avec 7 g d'algues et 20 g de lignocellulose

	Sucres_{tot} (g)
Lignocellulose + NaOH	0,87 \pm 0,15
Algues + lignocellulose + NaOH	1,46 \pm 0,11
Différence (sucres des algues seulement)	0,59 \pm 0,07

Le Tableau 4.8 atteste l'hypothèse de la lyse alcaline. Initialement, dans la solution de microalgues, la quantité de sucres totale excluant la cellulose est de 0,59 g (8,6% m/m des algues, tel que déterminé par la dépolymérisation standard sur les algues). La différence entre l'échantillon avec les algues et le blanc, après la filtration, est aussi exactement de 0,59 g, représentant 100% de récupération. Le NaOH semble alors lyser complètement les algues et la

partie retenue par le filtre de lignocellulose peut alors représenter de la biomasse algale résiduelle (fragments d'algues). Le Tableau 4.9 présente les résultats du vapocraquage de ces 2 échantillons.

Tableau 4.9 Sucres totaux identifiés après vapocraquage à 220 °C / 3 min d'algues et/ou lignocellulose avec et sans imprégnation 10% m/m de NaOH

	Sucres _{tot} (g)
Blanc (lignocellulose + NaOH)	0,84 ± 0,27
Lignocellulose + algues, avant microfiltration	1,50 ± 0,23
Lignocellulose + algues, après microfiltration	1,14 ± 0,31

Il est possible de remarquer que les algues n'apportent pas une valeur ajoutée significative dans la concentration en sucres après vapocraquage, étant donné qu'une grande majorité des sucres est sortie lors de l'étape de filtration. Au Tableau 4.9, les résultats avant et après la microfiltration furent générés pour connaître la fraction non solubilisée des algues, s'il y en a en solution. Leurs valeurs similaires, en prenant en compte les écarts types, indiquent que les sucres sont alors en grande partie solubilisés. Après le vapocraquage et avant la microfiltration, la différence entre le filtre de lignocellulose avec les algues (2^e entrée du Tableau 4.9), et le blanc (1^{re} entrée du même tableau) est de 0,66 g et après la microfiltration (3^e entrée) de 0,30 g. Étant donné que la quantité en sucre est plus élevée que celle perdue durant la filtration (au Tableau 4.8, qui avait déjà un bilan de masse à 100%), le bilan des sucres s'élève donc au final à 212%. Il est difficile de confirmer avec certitude que les algues apportent des sucres supplémentaires dans l'eau de vapocraquage, étant donné les très grands écarts types obtenus.

Par ailleurs, suite au traitement de la lignocellulose par vapocraquage, la cellulose produite ne semblait pas d'une grande qualité (voir Figure 4.18). La couleur foncée laisse présager la présence de lignine non solubilisée. Un des facteurs expliquant cette mauvaise production est probablement l'excès de la solution de 10% m/m NaOH présent dans les fibres. Normalement, lors de la production de cellulose, les fibres sont pressées à 95 psi pour en retirer l'excès. Par contre, dans cette démarche, les algues à la surface du filtre empêchent de presser les fibres. Il y aurait alors une grande perte d'algues qui se retrouveraient collées sur la surface du piston. Dans l'ensemble, les paramètres ne sont donc pas idéaux pour la production de cellulose. Le vapocraquage de lignocellulose traitée dans les mêmes conditions (sans retirer l'excès de 10% m/m NaOH), mais sans algues, produit le même type de cellulose. Les algues n'agissent donc pas comme inhibiteur dans la production de cellulose de belle qualité, mais l'excès de 10% m/m NaOH en serait responsable.



Figure 4.18 Cellulose de *Salix miyabeana* après filtration des algues avec 10% m/m de NaOH, après vapocraquage à 220 °C

Pour vérifier avec plus de certitude les 2 effets obtenus (pertes à la filtration et lors du vapocraquage), une matière inerte a été utilisée comme média filtrant afin d'enlever la grande variabilité obtenue suivant l'utilisation de la lignocellulose. Les algues sont alors filtrées, avec 10 % m/m de NaOH, sur de la fibre de verre. Les sucres quantifiés viendront alors absolument des algues, ce qui confirmera les tendances observées précédemment. Voir la Figure 4.19 pour un exemple de filtre formé après la captation des algues.



Figure 4.19 Algues filtrées (11 g / 100 ml à 10% m/m de NaOH) sur 20 g de fibre de verre

Après la filtration sur la fibre de verre et le vapocraquage à 220°C, la variabilité sur le bilan des sucres a grandement diminué. Ce bilan massique atteint alors 121%, une amélioration par rapport au 212% obtenu plus tôt. Les quantités obtenues à la filtration et après le vapocraquage sont alors ramenées sur une base de 100% (au lieu du 121%). Au niveau de la filtration avec NaOH, 58% des sucres totaux sont récupérés, comparativement au test précédent qui avait montré 100 % à cette étape. Le liquide sortant, étant exempt de la couleur noire de la lignine, était très vert, la même couleur que celle observée lors des tests de floculation avec le NaOH. Après vapocraquage à 220 °C, 42 % des sucres totaux sont alors retrouvés (voir Tableau 4.10). En raison de la nature non réactive du média filtrant, les écarts types ont grandement diminué par rapport aux expérimentations avec la lignocellulose comme média filtrant.

Tableau 4.10 Résultats de filtration de 11 g d'algues et de vapocraquage à 220°C avec 10% m/m de NaOH sur une matrice de fibre de verre

	Sucre _{tot} (g)	Sucre _{tot} (%)
Après filtration sur fibre de verre	0,57 ± 0,15	58 ± 15
Après vapocraquage	0,41 ± 0,10	42 ± 10
TOTAL	0,97 ± 0,25	100 %

L'effet du vapocraquage sur les algues (sans imprégnation au NaOH) a aussi été testé et les résultats sont présentés au Tableau 4.11 ci-dessous. Cette démarche vise à clarifier si le vapocraquage brise les cellules ou si l'extraction des métabolites est uniquement le résultat de la lyse alcaline. Pour vérifier l'impact réel du procédé à la vapeur, les algues ont alors été directement placées sur de la fibre de verre et traitées avec le vapocraqueur, sans imprégnation au NaOH ni filtration. Les résultats en découlant sont présentés au Tableau 4.11.

Tableau 4.11 Résultats après vapocraquage à 220 °C de 11 g d'algues sur de la fibre de verre sans imprégnation au NaOH suivi d'une post-hydrolyse à 4% acide

	g sucre / g algue
Avant microfiltration	0,060 ± 0,018
Après microfiltration	0,045 ± 0,008

En éliminant l'étape de filtration qui engendrait nécessairement des pertes, l'effet du vapocraquage seul sur les algues peut alors être vérifié. Considérant les différentes masses utilisées pour les essais de vapocraquage, la quantité extraite est présentée en taux massique relatif ($g_{\text{sucre}} / g_{\text{algue}}$). La récupération de sucres avant et après la microfiltration est légèrement différente, laissant croire qu'une petite fraction des algues n'a pas explosé. Les résultats du Tableau 4.11 rapportent qu'environ 25% de la masse ne serait pas solubilisée. Par contre, dû aux écarts types importants, il est impossible de conclure avec certitude sur cette tendance. Cette différence peut être due aux erreurs de quantification, sans mettre de côté que certaines algues, surtout celles positionnées au centre de la biomasse, n'aient pas été aussi bien cuites que les algues à la surface due à une distribution non optimale de la vapeur.

La grande variation observée pourrait également être liée à la quantification des sucres au HPLC, aux pertes d'algues durant les manipulations ou à la variabilité de composition des algues. Tous ces éléments ensemble peuvent expliquer les écarts observés, surtout lorsque sont prises en considération les petites masses quantifiées.

La Figure 4.20 montre une image au microscope de la solution après vapocraquage à 220 °C où plusieurs particules sont clairement visibles, incluant les algues. Il semble aussi qu'une partie de ces algues soit encore intacte, car leurs dimensions sont identiques à celle des algues avant traitement de vapocraquage (A et B sur la Figure 4.20). Par contre, des petits fragments

(C et D sur la Figure 4.20) sont aussi visibles et leur taille moyenne est plus petite qu'initialement (de 2 à 4 fois plus petite). Il peut s'agir d'algues ayant éclaté après le traitement à la vapeur.

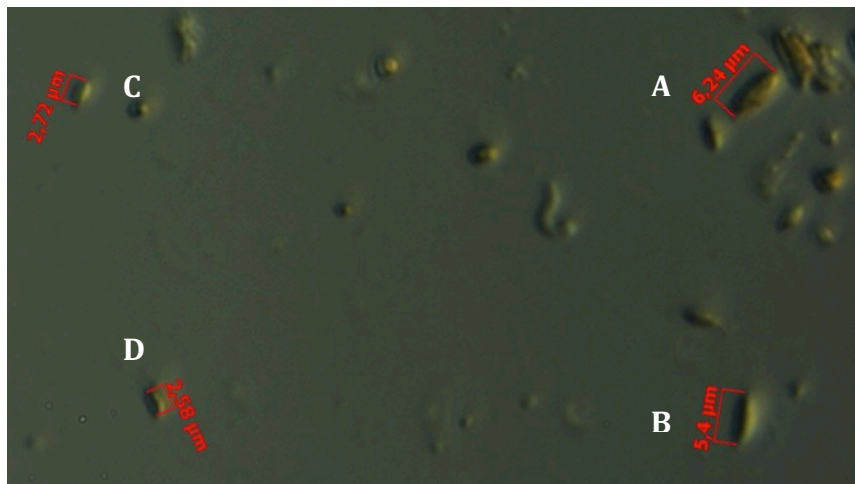


Figure 4.20 Image au microscope inversé à épifluorescence Zeiss (Axio Observer D1) des microalgues après vapocraquage sans imprégnation au NaOH (220 °C / 3 min) (630x)

Le traitement par vapocraquage était initialement destiné à extraire les métabolites des algues, mais plus particulièrement les lipides. Toutefois, la quantification des sucres a été utilisée pour voir l'effet du procédé sur les algues, considérant que la quantification des glucides est une analyse standard au laboratoire. La quantification des acides gras est, quant à elle, plus compliquée, particulièrement dans des solutions diluées. Un essai a toutefois été fait sur les eaux après vapocraquage pour vérifier si des acides gras pouvaient être quantifiés, et donc disponibles.

Pour cette quantification, une extraction liquide-liquide a été faite avec de l'hexane sur plusieurs eaux combinées contenant les algues et la lignine. Les différentes eaux ont été mélangées pour augmenter la quantité d'acide gras quantifiable, puis concentrées par rotavapeur jusqu'à un volume d'environ 800 ml. Ensuite, la lignine a été précipitée par acidification puis filtrée. La solution a ensuite été extraite à trois reprises, chaque fois avec une solution de 200 ml d'hexane. Le solide (lignine) a aussi été lavé directement sur le filtre, avec un volume de 100 ml d'hexane. La phase organique a ensuite été mise au rotavapeur jusqu'à évaporation complète du solvant. La différence de masse entre le ballon vide initial et après évaporation du solvant représente alors, théoriquement, la masse d'acides gras extraits. Par contre, aucune différence de masse n'a été constatée avant et après le rotavapeur. Une hypothèse expliquant ce phénomène est que le solvant n'a pas permis la solubilisation des acides gras ou une autre option serait qu'il n'y avait pas d'acides gras dans le mélange (contrairement à la quantification des acides gras faite par le CNRC). Pour contrer l'hypothèse du solvant, une extraction au dichlorométhane a ensuite été testée suivant la même méthode, sur les eaux des algues vapocraquées avec la fibre de verre (donc sans présence de lignine). Après décantation, le solvant a une légère couleur verte, laissant présager qu'il soit peut-être moins spécifique que l'hexane. Plusieurs lavages au dichlorométhane ont été faits afin de retirer

le plus possible cette couleur verte. La solution finale est ensuite mise au rotavapeur et pesée. Les résultats sont présentés au Tableau 4.12.

Tableau 4.12 Extraction au dichlorométhane des eaux après vapocraquage à 210°C, sans imprégnation au NaOH, de 20 g et 14,5 g d'algues (b.s.)

	Masse (g)	%Massique
Acide gras quantifiés	0,42	2,10 %
	0,37	2,59 %
MOYENNE		2,34 ± 0,34 %

L'extraction totale des lipides a donc atteint 2,34%, ne représentant qu'une fraction de la quantification originale du taux de lipides dans les algues, tel que dosé par le CNRC (29,8%, voir Tableau 3.1). Parmi les explications possibles, la méthode de quantification elle-même peut être mise en doute. L'approche a toutefois permis de confirmer une extraction par le vapocraquage.

4.6 Fermentation

Suivant la saccharification (ASTM D5896-96) de 5 g de cellulose (Figure 4.21) combinée à 1,3 g d'algues (Figure 4.22), les mélanges ont été neutralisés puis fermentés avec *Saccharomyces cerevisiae*. Les sucres issus de la cellulose (le blanc de fermentation) ont été supplémentés avec de l'urée (source d'azote) afin d'effectuer la fermentation. Une déficience en azote est la cause la plus commune pour les fermentations incomplètes. Ce manque affecte indirectement le taux de fermentation par l'activité intracellulaire qui ne peut se faire correctement et le rendement de biomasse [Varela *et al.*, 2004]. La différence entre les 2 échantillons hydrolysés repose sur la quantité initiale en sucres, en plus des autres nutriments apportés par les algues, pour le 2^e échantillon. Initialement, la concentration en sucres est supérieure à celle du blanc, dû à l'apport des algues. Cette contribution supplémentaire apporte évidemment plus de sucres convertibles en éthanol.

Le glucose est consommé rapidement par les levures, étant la source de sucre la plus facile à assimiler [Varela *et al.*, 2004]. Une fois les sucres épuisés, après 8 h de fermentation, la concentration d'éthanol se stabilise. Le maximum d'éthanol produit pour les 2 fermentations est de 18 g/L (sans algues) et de 28 g/L (avec algues). La différence au niveau de la production d'éthanol peut donc être attribuée aux algues. Le rendement de conversion des sucres est de 0,47 g éthanol / g sucres, considérant un taux de 26,1 % m/m de sucres dans les algues (quantification selon le CNRC). Le rendement théorique maximum pour une fermentation alcoolique est de 0,51 [Krishnan *et al.*, 1999]. La production théorique d'éthanol provenant des algues est alors de 0,12 g éthanol / g algues. Pour confirmer cette valeur, la fermentation des algues seules a aussi été effectuée (voir Figure 4.23).

Fermentation de 5 g de cellulose + urée

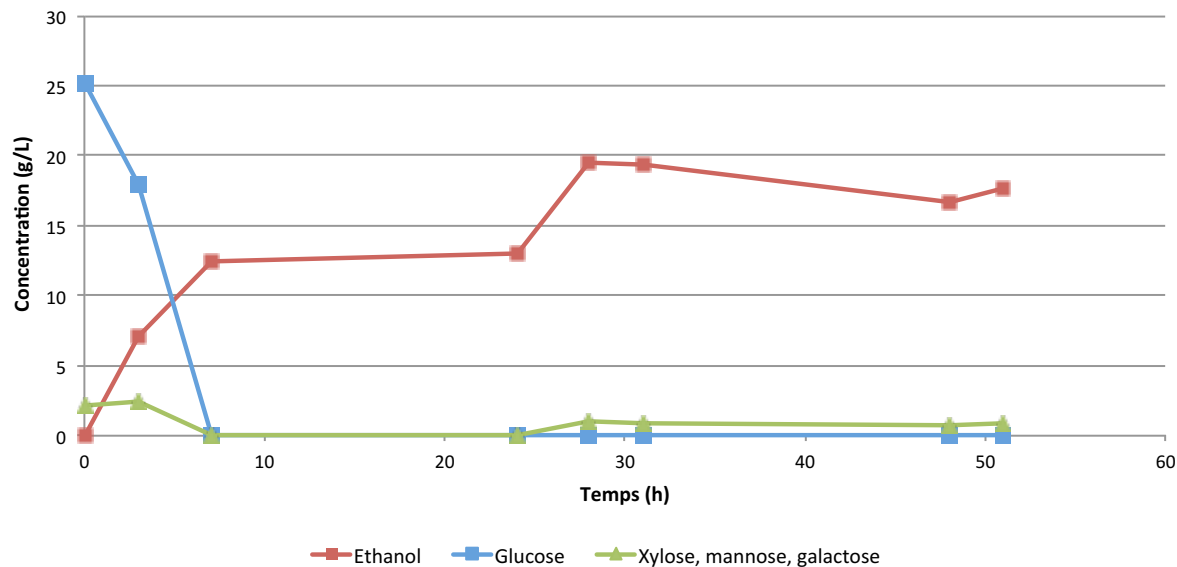


Figure 4.21 Fermentation par *Saccharomyces cerevisiae* de 5 g de cellulose additionnée de 0,2% m/m d'urée après saccharification (ASTM D5896-96) dans un volume 100 ml

Fermentation de 5 g de cellulose avec 1,3 g d'algues sec

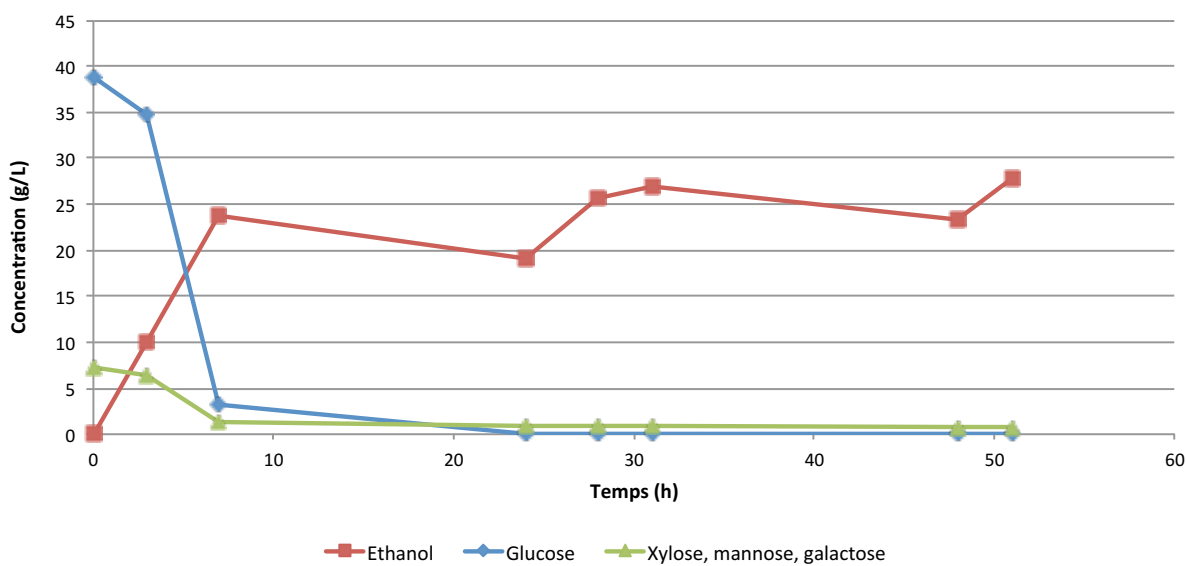


Figure 4.22 Fermentation par *Saccharomyces cerevisiae* de 5 g de cellulose avec 1,3 g d'algues (b.s.) après saccharification (ASTM D5896-96) dans un volume de 100 ml

Les résultats confirment que le milieu à base d'algues hydrolysées est fermentable (Figure 4.23). Une fois traités dans un milieu acide concentré, les sucres des algues se retrouvent en majorité sous une forme assimilable (à l'exception d'environ 1 g/L de sucres non assimilables par ce type de levure). Le rendement de cette fermentation est de 0,55 g éthanol / g sucres, concordant avec le rendement théorique de 0,51 g éthanol / g sucres [Krishnan *et al.*, 1999]. Par contre, une hydrolyse à 4 % H₂SO₄, utilisée généralement pour les macromolécules glucidiques amorphes, a démontré ne pas hydrolyser les polysaccharides glucidiques cellulosiques présents dans les algues. Ainsi, selon la quantité de sucre originalement contenue dans les algues (8,6 % excluant la cellulose), le rendement pratique par algues est de 0,04 g éthanol / g algues. Ce rendement pourrait facilement être augmenté en utilisant des algues optimisées pour leur contenu en sucres ou en utilisant une hydrolyse mieux adaptée aux algues.

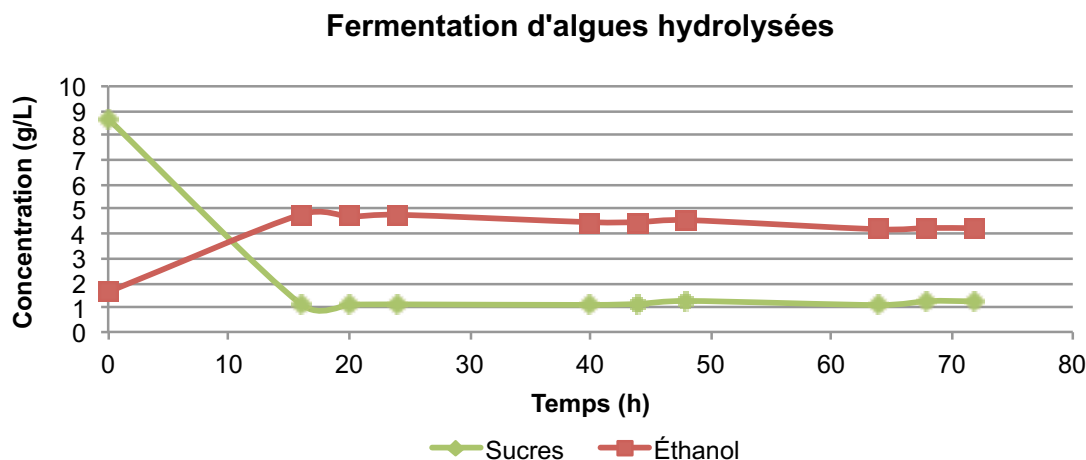


Figure 4.23 Variation de la concentration en sucres et en éthanol lors de la fermentation par *Saccharomyces cerevisiae* de 12 g (b.s.) d'algues hydrolysées (ASTM D5896-96)

La fermentation n'est possible que s'il y a une quantité suffisante d'azote dans le milieu. Sans azote, les levures ne sont pas en mesure de capter les sucres, nuisant aux transporteurs transmembranaires [Varela *et al.*, 2004]. Donc, en fonction de leur teneur protéinique (33,3%), les algues pourraient agir comme source d'azote (totale ou complémentaire) pour la fermentation. Les glucides provenant des algues peuvent également compléter les sucres cellulosiques lors de la production d'éthanol de 2^e et 3^e génération.

Le protocole d'hydrolyse à 72 % H₂SO₄ (ASTM D5896-96) et le même protocole modifié (95 °C / 45 min / 30% m/m H₂SO₄ au lieu de 121 °C / 1 h / 4% m/m H₂SO₄) par le partenaire ont été testés sur une petite masse d'algues (1 g humide ou 0,22 g sec) afin de confirmer l'hypothèse posée sur la quantité de cellulose (17,5 % m/m). À la fin du traitement, le volume final (pour les 2 protocoles) a été neutralisé avec du CaCO₃ pour faire précipiter les sulfates et réduire l'acidité pour l'analyse au HPLC, qui est sensible aux importantes concentrations d'acide.

L'application du protocole ASTM standard sur les algues ne démontre pas d'hydrolyse de la cellulose, telle que le démontre le Tableau 4.13. Cette hydrolyse devrait normalement donner plus de glucose, en raison de l'hydrolyse de la cellulose présente dans les algues. Le taux de glucose, pour 0,22 g d'algue, est de 0,004 g, obtenu par une hydrolyse à 4% H₂SO₄. Ce test démontre aussi la variabilité dans la composition et dans l'analyse des sucres algaux. Dans ce test, une hydrolyse ASTM à 72% H₂SO₄ génère une plus faible quantité de sucres qu'une hydrolyse standard à 4%, représentant pourtant un traitement moins sévère.

Tableau 4.13 Rendement en sucres suite à l'hydrolyse de 0,22 g d'algue avec le protocole ASTM D5896-96 à 72 % H₂SO₄ non-modifié

	Sucres (g)
Glucose	0,003 ± 0,001
Xylose (et autres sucres C5 et C6)	0,006 ± 0,001
TOTAL	0,010 ± 0,002

Suite au protocole ASTM modifié (95 °C / 45 min) (voir Tableau 4.14), la quantité de sucres solubilisés est deux fois supérieure à celle avec le protocole ASTM standard (121 °C / 1 h). L'hydrolyse devrait augmenter la quantité de glucose, c'est pourtant la quantité de xylose (ou autres sucres à 5C) qui est majoritairement influencée. Il s'agit alors d'un autre bon exemple pour prouver la variabilité de la composition et de l'analyse. Théoriquement, la quantité de xylose devrait être la même pour les deux différents protocoles à moins, bien entendu, que différents sucres co-éluent lors des analyses HPLC.

Tableau 4.14 Rendement en sucres suite à l'hydrolyse de 0,22 g d'algue avec le protocole à 72 % H₂SO₄ modifié

	Sucres (g)
Glucose	0,006 ± 0,002
Xylose (et autres sucres C5 et C6)	0,017 ± 0,000
TOTAL	0,023 ± 0,002

Tout comme dans les cas précédents, les très petites masses quantifiées rendent impossible de conclure si les différentes hydrolyses à 72% H₂SO₄ dépolymérisent bien la cellulose de la paroi algale. Le protocole modifié par le partenaire semble à ce niveau plus efficace que le protocole ASTM. Au niveau analytique, lorsque les études portent sur des faibles concentrations, une simple intégration manuelle au HPLC peut faire la différence entre un rendement de 100 % et 200 %. Le fait de mettre initialement plus d'algues, qui contiennent de l'eau, va aussi accroître le volume d'acide entraînant au final le même problème de faible concentration. Par contre, les résultats démontrent que l'hydrolyse des algues en parallèle avec les fibres de cellulose va ajouter plus de sucres sous formes fermentables, ce qui ultimement augmentera la production d'éthanol.

CHAPITRE 5 - Discussion

5.1 Coagulation / Flocculation

L'étape de coagulation / flocculation semble à priori nécessaire, mais elle peut s'avérer être la plus longue et peut être la plus dispendieuse du procédé proposé. Dans les cultures à très grande échelle, la flocculation en continu est utilisée sans quoi le volume envoyé à la filtration serait très élevé. De plus, la filtration d'une culture ayant une plus grande concentration s'est montrée plus efficace qu'une culture plus diluée. Un plus petit volume concentré en algues est donc plus facilement filtrable qu'un grand volume dilué. La sédimentation est due à l'augmentation du pH et l'ajout de sels, induisant la flocculation. L'utilisation d'agents flocculants entraîne une augmentation du coût de l'étape de concentration. Toutefois, une fraction du milieu pourrait être recyclée pour servir à nouveau de milieu de culture pour les algues. Malgré une baisse des nutriments due à la première croissance, l'ajout de MgSO_4 permet de rétablir une concentration propice à la croissance. Par contre, ce milieu étant basique, l'eau devra vraisemblablement être diluée avec d'autres sources avant d'être réutilisée. L'acidification pourrait aussi être envisagée en utilisant du CO_2 , laquelle pourrait s'avérer très fonctionnelle (dépendamment du type de sel utilisé).

De petits tests de mise à l'échelle ont été faits et il semblerait que la séparation peut se faire dans un délai de 24h pour des volumes compris entre 0,02 et 1 L. Un point critique pour cette opération est toutefois l'agitation. Pour de très grands volumes, cette séparation batch pourrait peut-être prendre beaucoup plus de temps, mais elle permettrait de gagner au niveau de la filtration. Le fonctionnement de cette étape dépend du type de culture d'algues utilisée, en photobioréacteur (flocculation batch, nécessite un temps de sédimentation) ou en étang ouvert (flocculation en continu, plus rapide). Avant une application à l'échelle industrielle, d'autres méthodes devraient vraisemblablement être testées. Celle-ci s'est avérée efficace, mais peut-être pas la plus adéquate pour de grands volumes.

5.2 Filtration

La filtration sur cellulose ou lignocellulose s'est démontrée efficace pour capter les algues. Peu importe le type de fibres, elles doivent d'abord être mises en forme, ce qui représente nécessairement une étape supplémentaire. Avec des fibres lignocellulosiques, un compromis entre la vitesse de filtration et l'efficacité est nécessaire. Plus les fibres sont compactées, plus la filtration sera efficace, mais plus le débit sera lent. L'idéal semble être de ne pas compacter du tout les fibres afin d'éliminer une opération unitaire supplémentaire, mais la lignocellulose doit alors être produite avec un haut facteur de sévérité afin d'obtenir les plus petites fibres possible. L'idée de perdre un peu d'efficacité est très envisageable pour avoir un bon débit de filtration. Les algues non captées (seulement 1 % selon les tests) pourraient ainsi servir d'inoculum pour redémarrer une nouvelle culture.

Pour les fibres cellulosiques, étant initialement de plus petites dimensions que les fibres lignocellulosiques, aucun moulage n'a été nécessaire. La filtration se fait très facilement et est beaucoup moins variable que pour la lignocellulose, étant plus homogène. Par contre, ces

fibres se saturent plus rapidement, diminuant le débit de filtration jusqu'au colmatage complet où plus aucun liquide ne peut traverser le filtre.

La porosité est un élément crucial pour la rétention des microalgues et tous les paramètres étudiés influencent grandement cette propriété. L'optimal trouvé ici n'est alors pas nécessairement celui qui sera approprié pour une autre souche d'algues. Par contre, la souche utilisée figure parmi les plus petites laissant présager une efficacité comparable ou supérieure pour les autres cultures.

L'effet de mise à l'échelle n'a pas été étudié et pourrait représenter un facteur affectant grandement le fonctionnement et les résultats de filtration. La masse a été variée, mais elle n'a pas démontré une augmentation linéaire du volume filtré, plutôt une diminution d'efficacité, probablement dû à une trop grande restriction. L'effet de surface, affecté par la mise à l'échelle, est probablement le facteur qui pourrait faire grimper linéairement la quantité filtrée. Il s'agit toutefois d'une hypothèse qui devrait être vérifiée pour la faisabilité de la filtration sur des fibres à grande échelle.

De plus, à une échelle industrielle, la filtration sous vide serait probablement plus facile à adapter. L'investissement en capital serait vraisemblablement plus élevé dans le cas d'une presse hydraulique et son utilisation pourrait s'avérer plus risquée que l'utilisation d'une pompe sous vide.

5.3 Vapocraquage

Il a été abordé précédemment, lors de l'étape de floculation, que le NaOH attaque les membranes des algues, les brisant, relâchant la chlorophylle et les autres métabolites intracellulaires. Ce projet de recherche avait initialement comme objectif d'imprégner les fibres lignocellulosiques (avec une solution de 10 % m/m de NaOH) tout en captant les algues. Toutefois, il a été démontré que l'utilisation du NaOH détruit les parois cellulaires et entraîne une perte des glucides/lipides. Durant la filtration de ce milieu, la biomasse algale ou les fragments provenant de la dégradation de cette dernière peuvent être captés, tandis que les composés solubilisés passent librement à travers le filtre.

L'étape d'imprégnation de la lignocellulose simultanément à la filtration des algues entraîne une perte des composés intracellulaires par lyse alcaline. Ces composés migrent alors dans le liquide filtré, composé de 10 % m/m de NaOH et de lignine. Pour récupérer cette lignine perdue durant l'imprégnation, ce mélange devrait être mélangé avec le liquide sortant du vapocraquage à la fin du procédé. Cela permettrait alors de récupérer la lignine et d'effectuer sa dépolymérisation par une augmentation de la température. Les pertes de sucres provenant des algues, estimées à 58 % tel que vu au Tableau 4.10, seront alors irrécupérables. Il s'agit d'une trop petite quantité dans un grand volume d'eau basique concentré en lignine.

D'un autre côté, la lyse alcaline pourrait aussi être optimisée pour briser la totalité des algues. Le vapocraquage des algues (si algues déjà lysées) deviendrait ainsi uniquement pour la délignification de la lignocellulose. L'imprégnation de la lignocellulose et la filtration des

algues pourraient être séparées, mais le procédé devrait alors être repensé. Un procédé hypothétique avec recyclage de l'eau d'imprégnation est présenté à la Figure 5.1.

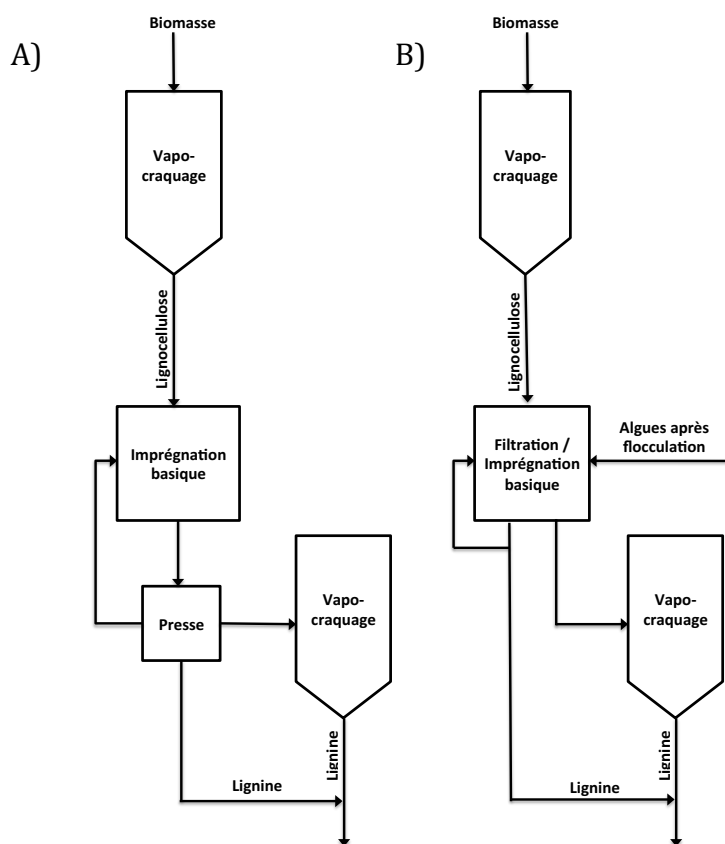


Figure 5.1 A) Schématisation des procédés de transformation de la lignocellulose initiale et B) procédé modifié avec l'ajout de la transformation des algues

Dans la Figure 5.1 A), l'étape de la presse ajoute la possibilité de retirer le surplus d'eau d'imprégnation de la biomasse. Dans la Figure 5.1 B), cette étape est retirée, car il est impossible de presser adéquatement la lignocellulose avec un gâteau d'algues sur le dessus. Toutefois, le fait de retirer cette étape entraîne une production de cellulose de mauvaise qualité. Il y aurait alors possibilité d'utiliser un vide pour obtenir une certaine équivalence, mais les essais avec -28,5 pouce de Hg n'ont toutefois pas généré des résultats concluants.

Après vapocraquage, les acides gras se retrouveraient en principe dans une solution d'environ 10 L d'eau de lavage (pour l'échelle utilisée dans les expériences). Leur concentration visant leur transformation représente alors une étape et des coûts supplémentaires. Contrairement aux sucres obtenus par hydrolyse pour la fermentation, les acides gras n'agissent pas comme un supplément à des acides gras déjà existants. Il s'agit alors d'un tout nouveau procédé de transformation qu'il faut inclure. Par contre, le biodiésel se vendant plus cher que l'éthanol, cette voie pourrait tout de même être rentable dépendamment, bien entendu, des volumes d'eau qu'il faudra évaporer.

L'impact du vapocraquage sur les algues est difficile à déterminer avec précision, mais il semble clair d'affirmer qu'une solubilisation de la masse algale est observée, chose qui a été démontrée par une quantification des sucres et des acides gras. Les bilans ne semblent pas se fermer complètement à 100%, probablement en raison de la variabilité de la composition des algues et la quantification par le HPLC. Ces 2 paramètres appliqués sur de très faibles masses augmentent aussi grandement la variabilité des résultats.

5.4 Hydrolyse acide / fermentation

Le protocole d'hydrolyse de la cellulose utilisé nécessite un très grand volume d'eau (72 % H_2SO_4 , dilution jusqu'à 4 %). Ceci est acceptable à une l'échelle laboratoire, mais à plus grande échelle et avec de grandes masses de cellulose à hydrolyser, cela engendrerait de très grands coûts tant au niveau du transport de la solution sucrée qu'au niveau de l'utilisation de produits et d'énergie (si concentration par rotavapeur). Par exemple, pour 1 kg de cellulose (avec une hypothèse de 50 % humidité), il faut 1,3 kg d'acide et 31 kg d'eau pour diluer. À un tel niveau, ce protocole ne semble pas être le plus adéquat. De plus, l'ajout des algues au procédé d'hydrolyse augmente grandement la quantité de produits nécessaire en raison de l'important taux d'humidité de cette biomasse complémentaire.

En ce qui concerne la fermentation, l'utilisation d'algues ayant des concentrations en sucres fermentables plus élevées augmenterait évidemment le rendement total de production d'éthanol. Les algues utilisées dans le cadre de ce projet ne sont pas optimales pour la fermentation, mais elles ont tout de même démontré qu'elles pouvaient être fermentées. La transformation et conversion simultanée de la cellulose avec les algues permettrait alors de produire de l'éthanol de 2^e et 3^e génération sans apporter de coûts supplémentaires au procédé de fermentation de la cellulose, voir même en le diminuant considérant l'apport protéinique.

5.5 Bilan de masse

Un bilan de masse est fait sur l'ensemble du procédé, en utilisant comme hypothèse de base un volume de 100 L de culture à traiter. Chacune des différentes sections du procédé est présentée individuellement et les hypothèses utilisées sont présentées à la fin de cette section. Ce bilan peut être fait différemment si la filtration sur la lignocellulose ou sur la cellulose est utilisée. La voie prise par les microalgues ne sera alors pas la même. Voir la Figure 5.2 pour la visualisation des différentes voies proposées par le procédé envisagé. Une vue d'ensemble du procédé est présentée en Annexe 8 et le bilan de masse complet est présenté en Annexe 9.

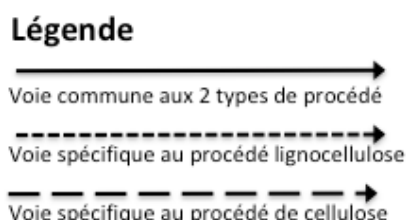


Figure 5.2 Légende des différents écoulements dans le bilan de masse du procédé proposé

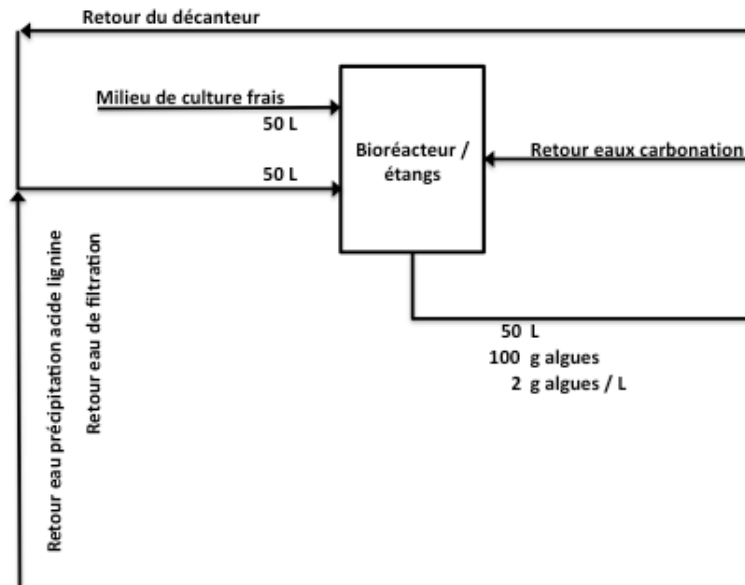


Figure 5.3 Recyclage des eaux du procédé pour une culture d'algues à 2 g/L avec hypothèse de recyclage des eaux de 50%

La première étape concerne la culture des microalgues, soit en bioréacteurs (très coûteux) ou en étangs aérés extérieurs. La Figure 5.3 permet de visualiser les différentes eaux qui peuvent être recyclées dans le procédé. Après la sédimentation des algues, l'eau est basique par l'utilisation de Ca(OH)_2 , et contient du MgSO_4 . Après coagulation et floculation, il peut rester en solution des ions magnésium et calcium nécessaires pour la culture des microalgues. Cette eau peut aussi subir un traitement de carbonation pour récupérer du CaCO_3 tout en acidifiant l'eau plus près du pH optimal de culture (aux alentours d'un pH de 6,6). La lignine, récupérée après un traitement de vapocraquage, subit une dépolymérisation à haute température. L'eau acidifiée peut retourner pour la culture avec l'eau basique provenant de la sédimentation. Finalement, l'eau après la filtration peut aussi être réacheminée vers la culture des algues, seulement si c'est la filtration sur de la cellulose qui est utilisée, car avec la lignocellulose, l'eau sortant de la filtration est à 10 % m/m de NaOH et chargée en lignine. Évidemment, les eaux usées industrielles doivent aussi être utilisées pour la culture. La fraction de récupération de chacune pour faire la meilleure combinaison possible est seulement basée sur une hypothèse de récupération de 50 % des eaux usées.

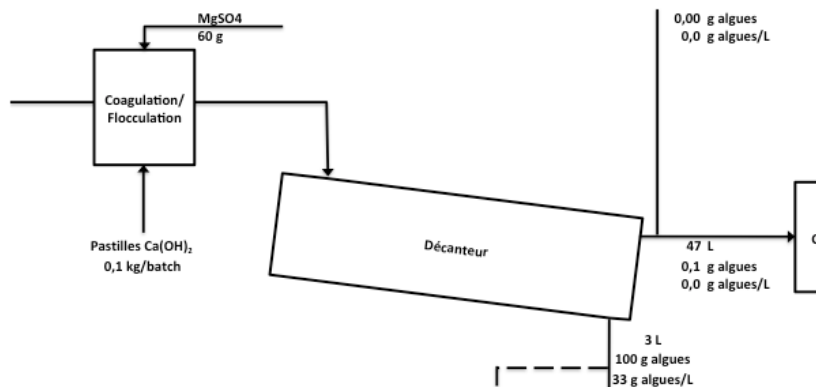


Figure 5.4 Pré-concentration par coagulation/floculation avec, comme hypothèse, une diminution de volume de 94%

La seconde étape est celle de pré-concentration par coagulation/floculation présentée à la Figure 5.4. Les conditions idéales trouvées précédemment impliquent du $\text{Ca}(\text{OH})_2$ à saturation et 10 mM de MgSO_4 . À la sortie, après décantation de la solution, le volume est diminué de 94 % et la concentration algale augmentée de 16 fois. Le surnageant peut ensuite être traité par carbonation, tel que présentée à la Figure 5.5. Cette section est purement hypothétique, mais peut être envisagée si le CaCO_3 peut aider à augmenter les sources de revenus du procédé où être récupéré ailleurs dans la bioraffinerie, comme pour la neutralisation des solutions de sucres.

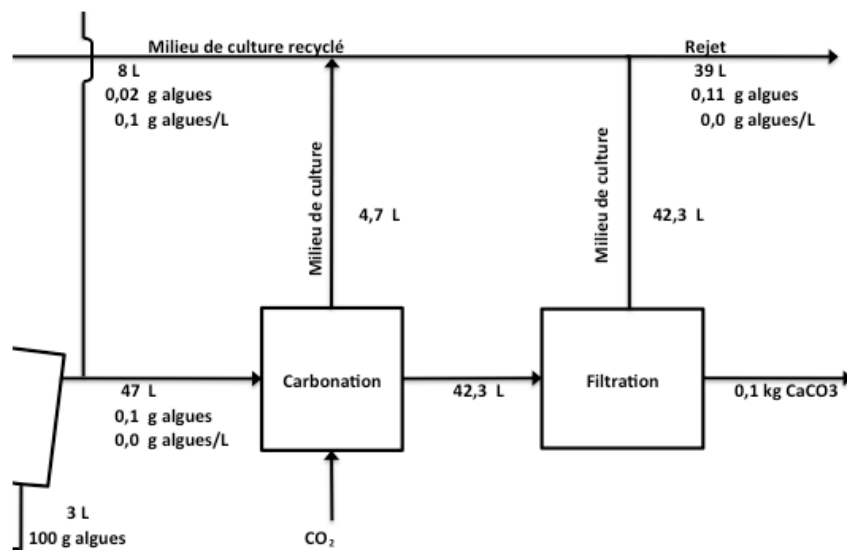


Figure 5.5 Étape de récupération de l'eau de décantation par carbonation

La prochaine étape, présentée à la Figure 5.6, est la concentration par filtration. Le cas ici présenté montre la filtration sur les fibres lignocellulosiques, nécessitant une imprégnation à 10 % m/m de NaOH. Les fibres et les algues sont ensuite envoyées au vapocraquage. Le filtrat (lignine + NaOH) pourrait ensuite être additionné à l'autre solution de lignine sortant du vapocraquage (incluant des pertes de 58% de composés intracellulaires) pour la dépolymérisation de la lignine.

Figure 5.7 Étape de vapocraquage des algues suivie de la précipitation acide de la lignine avec une récupération de 42% de sucres et lipides

À la Figure 5.7, les algues et la lignocellulose sont envoyées au vapocraquage. Le liquide sortant est ensuite envoyé à la dépolymérisation de la lignine. Le liquide suite à la dépolymérisation peut ensuite retourner pour la croissance des algues, lequel peut être mélangé avec l'eau basique venant de la précipitation des algues. La Figure 5.8 montre la section d'hydrolyse de la cellulose et de la fermentation ainsi que les vapocraquages nécessaires pour la production de lignocellulose et de cellulose. La quantité envoyée à l'hydrolyse est de 0 g, étant donné que le bilan de masse fait pour la filtration sur lignocellulose est utilisé, donc avec la revalorisation des acides gras.

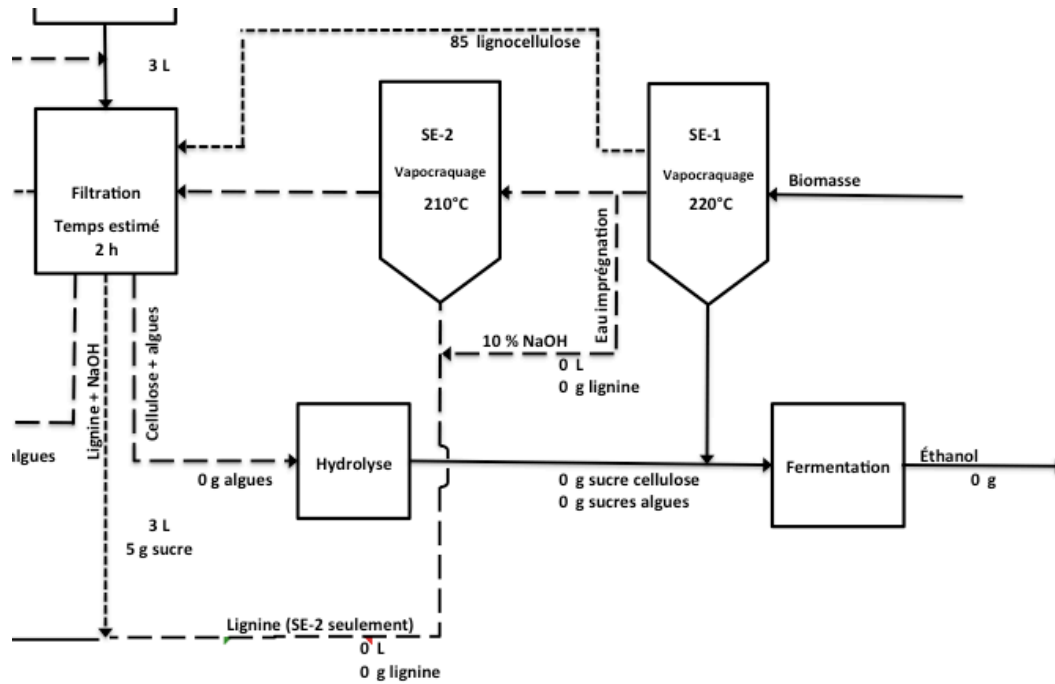


Figure 5.8 Étape de production de la lignocellulose et fermentation des sucres

Ce procédé peut être modifié afin de permettre une revalorisation des acides gras et des sucres, idéalement avec la voie de la filtration sur cellulose. Les acides gras peuvent possiblement être récupérés à l'étape de l'hydrolyse, mais il faut savoir ce qu'une grande concentration en acide sulfurique peut faire à ceux-ci. La liste des hypothèses nécessaires pour l'élaboration du bilan de masse est présentée à Figure 5.9.

Hypothèses d'opération	
Concentration de la culture d'algue	2 g/L
Volume réacteur	100 L
Recyclage de l'eau	50 %
Temps pour décantation	24 h
Dimution du volume au décanteur	94 %
Concentration MgSO ₄ pour flocculation	10 mM
Concentration NaOH pour délignification	10 %
Eau capté par la filtration	0,0016 L/g
Température de production de cellulose	210 °C
Hypothèse de perte de sucre avec 10% NaOH pour filtration	58 %
Masse maximale du SE (basé sur le MVC)	250 g sec
Ratio L/S imprégnation NaOH	10
Ratio fermentation g éthanol/g sucre (provenant cellulose)	0,51 g/g
Ratio fermentation g éthanol/g algue	0,04 g/g

Figure 5.9 Liste des hypothèses utilisées pour le bilan de masse

5.6 Analyse économique

Une analyse économique succincte a été faite pour l'ensemble du procédé. Les prix indiqués sont une vue statique une fois l'équilibre atteint, avant imposition, et sans l'investissement initial. Ces coûts sont une représentation des réactifs et produits nécessaires pour la réalisation du procédé. L'analyse énergétique et opérationnelle n'a pas été effectuée. Le cas de base utilisé est la production d'hémicelluloses et de celluloses, qui est déjà établie par le partenaire industriel. L'étape de culture des microalgues n'est pas présentée et est abordée dans d'autres projets de recherche. Pour l'étape de coagulation/floculation, un prix de 3,61 \$ / tonne biomasse est nécessaire, incluant l'utilisation de MgSO₄ et de Ca(OH)₂. L'étape de concentration par filtration ne demande alors pas de coûts additionnels, si ce n'est que pour l'énergie nécessaire pour la filtration sous vide. L'étape d'extraction aussi est à coût neutre, étant donné que les algues s'incluent dans un procédé (hydrolyse ou vapocraquage) qui serait fait même en leur absence. La fermentation est aussi normalement faite pour les hémicelluloses et la cellulose, alors les algues n'apportent pas de coûts supplémentaires pour cette étape. Par contre, du côté de la transformation des acides gras en biodiésel, il s'agit d'une étape spécifique pour les microalgues, alors un coût de 10,09 \$ / tonne biomasse est estimé pour cette transformation.

Les produits finaux sont alors, soit de l'éthanol ou du diésel et du glycérol. Pour une tonne de biomasse algale (b.s), il y aurait alors un revenu de 125,73 \$ (hypothèse de 1,93 \$US/gal) pour la production d'éthanol, 291,25 \$ (hypothèse de 2,86 \$US/gal) de diésel et 18,13 \$ de glycérol (hypothèse de 600 \$US/tonne). Ces valeurs se basent sur les prix des marchés de l'automne 2014 et sur la souche d'algues utilisées pour le projet. Il ne s'agit alors pas d'une souche d'algue optimisée pour une application particulière. Finalement, pour la transformation des algues en éthanol, le profit engendré, en négligeant les coûts d'opération, de main d'œuvre et les investissements initiaux, sont de 122 \$ / tonne et de 300 \$ / tonne pour le diésel.

Les sucres, agissant comme une plus-value dans le procédé de fermentation, augmentent alors la quantité d'éthanol produit. En prenant le plus petit rendement obtenu durant les

expérimentations, qui est de 0,04 g éthanol / g algue, il y aurait alors une augmentation des revenus minimaux de 8%, allant jusqu'à 24% pour la souche d'algue utilisée.

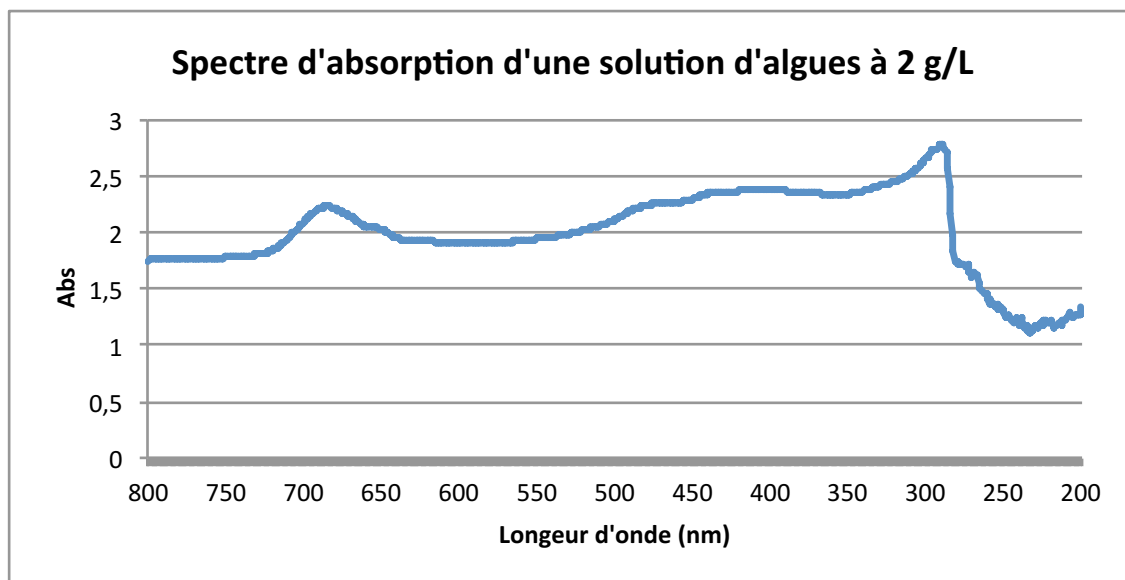
CHAPITRE 6 - Conclusion

Pour conclure, la faisabilité technologique a été vérifiée par les essais sur la filtration, le vapocraquage et la fermentation. Par contre plusieurs limitations doivent être prises en considération avant l'établissement d'un tel type de procédé à l'échelle industrielle. Des hypothèses ayant été utilisées lors du rapport se doivent d'être vérifiées, surtout l'effet de mise à l'échelle. La croissance n'est pas abordée dans ce projet, mais peut aussi représenter un point essentiel à vérifier avant l'acceptation du procédé. La filtration sur des fibres, soit lignocellulosiques ou cellulosiques, était le point central du projet. Cette technique de concentration s'est avérée efficace à petite échelle. La masse, la pression initiale, le type de fibre et la concentration de la solution d'algues sont tous des facteurs qui influencent l'indice de filtration $\text{g}_{\text{algues}} / \text{g}_{\text{fibre}}$. Le meilleur indice obtenu, qui est de 0.6, fut obtenu avec une concentration d'algue de 32 g/L (à la sortie du décanteur), avec des fibres cellulosiques non initialement pressées. L'efficacité de filtration s'obtient aux dépens du débit. Un bon milieu (entre débit et efficacité) doit alors être utilisé, sinon une filtration trop lente peut devenir le facteur ralentissant tout le procédé. L'extraction, soit par hydrolyse acide ou par vapocraquage, s'est démontrée être possible, mais difficile de conclure quant au niveau d'efficacité. Due aux réponses de masse très faible attendue et l'incertitude sur plusieurs valeurs, il est plus facile d'affirmer que l'extraction fonctionne, sans discuter de son efficacité. La transformation des sucres algaux a aussi démontré être efficace. Les algues sont alors fermentables sans apport extérieur de nutriments. Elles rajoutent une plus-value dans l'hydrolyse de la cellulose en augmentant la quantité d'éthanol produit et en conférant un apport de protéines.

À plus long terme, avec la construction d'une usine de gazéification Enerkem à Varennes près des installations de fermentation d'Ethanol Greenfield et avec le désir de la ville de gérer ses matières résiduelles organiques par biométhanisation, la création d'une synergie avec la transformation des algues et des différents procédés serait une manière très efficace de créer une boucle presque fermée en utilisant les rejets des procédés comme matières premières.

ANNEXE

Annexe 1. Spectre d'absorption à l'UV/Vis de *Scenedesmus* sp. AMDD à 2 g/L



Annexe 2. Procédure de mise en forme du filtre

Pour cette étape, il est important de fermer la vanne 2, d'ouvrir la vanne 1 et de commencer à descendre le piston (se référer à la Figure 3.2). Cela permet d'éviter de pousser de l'air au travers du filtre, ce qui pourrait créer des trous. Une fois le piston rendu sur la biomasse, ouvrir la vanne 2, pour permettre au surplus d'eau de s'écouler tandis que la vanne 1 peut rester ouverte. Une fois compactée à la pression voulue, fermer la vanne 2, s'assurer que la vanne 1 est ouverte, et remonter le piston. Si la vanne 2 reste ouverte, l'air entrera par le bas du filtre et ainsi le déplacer. En la fermant, l'air entrera par le dessus du filtre, par la vanne 1, évitant ainsi de le décoller.



Annexe 3. Standard Test Method for Carbohydrate Distribution of Cellulosic Materials (1/3)



Designation: D5896 – 96 (Reapproved 2007)

Standard Test Method for Carbohydrate Distribution of Cellulosic Materials¹

This standard is issued under the fixed designation D5896; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscript epsilon (ϵ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

1. Scope

1.1 This test method covers the determination of the carbohydrate composition of cellulosic materials such as ground wood meal, chemically refined pulp, mechanical pulps, brown-stocks, and plant exudates (gums) by ion chromatography. This test method is suitable for rapid, routine testing of large numbers of samples with high accuracy and precision. For a review of this technique, see Lee (1).²

1.2 The values stated in SI units are to be regarded as standard. No other units of measurement are included in this standard.

1.3 *This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.* For hazard statement, see Section 8.

2. Referenced Documents

2.1 *ASTM Standards:*³

D1193 [Specification for Reagent Water](#)

D1695 [Terminology of Cellulose and Cellulose Derivatives](#)

3. Terminology

3.1 For standard terminology of cellulose and cellulose derivatives, see Terminology D1695.

3.2 *Abbreviations:*

3.2.1 IC—ion chromatography,

3.2.2 SPE—solid phase extraction,

3.2.3 PAD—pulsed amperometric detector,

3.2.4 PED—pulsed electrochemical detector,

3.2.5 mM—millimolar.

4. Summary of Test Method

4.1 IC analysis of celluloses requires the following operations:

(1) sample preparation,

(2) total hydrolysis,

(3) dilution,

(4) SPE,

(5) ion chromatographic analysis, and

(6) calibration/calculation.

5. Significance and Use

5.1 This test method requires total hydrolysis of carbohydrate material to monosaccharides, and is thus applicable to any cellulosic or related material that undergoes substantial hydrolysis, including cellulose derivatives such as cellulose acetate.

5.2 The carbohydrate composition of a cellulosic material can be expressed on the basis of the total initial sample, or on the basis of the carbohydrate portion of the sample. The former requires quantitative handling and may require special knowledge of the other components present in order to establish the absolute carbohydrate level or determine individual wood hemicelluloses such as galactoglucomannan, etc. Since the solid portion of purified pulps is almost all carbohydrate (98 + %), the latter basis is often used to express the carbohydrate distribution as a percent.

5.3 If heated under alkaline conditions, isomeric sugars may begin to appear in the chromatogram. The major impurity present in purified pulps is saccharinic acids. These acidic components, and other anions such as sulfate, carbonate, and acetate are removed by a strong base anion exchange SPE, and would need to be determined separately to get a more exact carbohydrate distribution.

6. Apparatus

6.1 *Blender.*

6.2 *Screw Cap Culture Tubes*, 25 by 150 mm, outside diameter.

6.3 *Refrigerator.*

6.4 *Pressure Cooker.*

¹ This test method is under the jurisdiction of ASTM Committee D01 on Paint and Related Coatings, Materials, and Applications and is the direct responsibility of Subcommittee D01.36 on Cellulose and Cellulose Derivatives.

Current edition approved June 1, 2007. Published June 2007. Originally approved in 1996. Last previous edition approved in 2001 as D5896 - 96 (2001). DOI: 10.1520/D5896-96R07.

² The boldface numbers in parentheses refer to the list of references at the end of this test method.

³ For referenced ASTM standards, visit the ASTM website, www.astm.org, or contact ASTM Customer Service at service@astm.org. For *Annual Book of ASTM Standards* volume information, refer to the standard's Document Summary page on the ASTM website.

Annexe 3. Standard Test Method for Carbohydrate Distribution of Cellulosic Materials (2/3)



D5896 – 96 (Reapproved 2007)

- 6.5 *SPE Cartridges.*
- 6.6 *Water Bath.*
- 6.7 *Ion Chromatograph.*
- 6.8 *Moisture Balance.*
- 6.9 *Hot Plate.*
- 6.10 *Pipets.*

TOTAL HYDROLYSIS

7. Reagents and Materials

7.1 *Sulfuric Acid* (72 ± 0.1 weight %): To 1 volume of water, add slowly while stirring vigorously 2 volumes of concentrated sulfuric acid (sp gr 1.84). Standardize against an alkaline standard, and adjust to 72 ± 0.1 weight %.

8. Hazards

8.1 **Precaution:** Wear eye protection and chemical resistant gloves while working with strong acid.

9. Summary of Procedure

9.1 The total hydrolysis of cellulosic material requires a primary hydrolysis with strong mineral acid followed by a secondary hydrolysis in dilute acid. The primary hydrolysis results in the formation of a mixture of oligosaccharides; the secondary hydrolysis completes the conversion to monomeric sugars.

10. Sampling, Test Specimens, and Test Units

10.1 Extract wood samples with ethanol to remove extractives, then grind in a Wiley mill to pass a 40-mesh screen. Disintegrate (fluff) dry pulp or paper samples in a blender. Determine the moisture content using a moisture balance or similar device.

11. Procedure

11.1 Add 1 mL of cold, 72 % sulfuric acid to 100 mg of cellulose (bone dry basis) in a 25 by 150-mm screw top culture tube. (For wood samples, adjust sample size upward based on estimated polysaccharide content of the sample.)

11.2 Mix with glass rod, and place in refrigerator overnight (with glass rod in place).

11.3 Heat samples (with stirrers in place) at 30°C for 1 h.

11.4 Remove glass rod and rinse while adding 28 mL of water to each tube and, with caps on, place samples in a pressure cooker, and heat to 15 psi.

11.5 Maintain pressure at 15 psi for 1 h.

11.6 Cool to room temperature and dilute the sample to avoid overloading the analytical column (usually a dilution between 1 to 20 and 1 to 50 is adequate). Dilute with water containing a standard such that its concentration in the diluted sample is 2 ppm. D-Fucose (6-deoxy-D-galactose) or 2-deoxy-D-glucose make good internal standards.

11.7 Neutralization of the sample is not required, but improved resolution may occur if the sample is adjusted to pH

6–6.5 during the dilution step. Neutralization is recommended if the sample is to be stored before analysis.

11.8 Prepare an anion exchange SPE cartridge with 5 mL of water, pass 5 mL of sample through the cartridge, discarding the first 3 mL, and use the remaining 2 mL to fill a 0.5-mL injection vial. Additional 0.5-mL injection vials may be filled if multiple injections are planned.

11.9 Inject the samples onto an ion chromatograph operating as described in the following text.

HIGH-PERFORMANCE ION CHROMATOGRAPHY

12. Apparatus

12.1 *Ion Chromatograph*—This equipment can be assembled from the individual components, or purchased as a system.⁴

12.2 *Column*—The column must be suitable for separating monosaccharides and is generally protected by a suitable guard column. A column packing material that works well is composed of 10 μ m beads of surface-sulfonated polystyrene/divinylbenzene (2 % crosslinked), covered with porous latex beads containing alkyl quaternary amine functionality.

13. Procedure

13.1 Perform the analysis using an ion chromatograph.

13.2 Inject 100 μ L of sample onto the analytical column.

13.3 Detection is by PAD or PED in a pulsed amperometric mode using a gold working electrode.

13.4 Standard pulp samples are generally run isocratically at 1 mL/min using an eluant of 2.5 mM sodium hydroxide to obtain baseline resolution of fucose (internal standard), arabinose, galactose, glucose, xylose, and mannose in less than 30 min. If other sugars are present, it may be necessary to alter the eluant strength, or try a gradient approach.

13.5 Eluant is degassed and kept under helium (nitrogen may be substituted for helium).

13.6 A 0.5-mL/min flow of 0.3-M NaOH is added after the column, but prior to the detector to improve response.

14. Calibration and Standardization

14.1 Prepare standards of the individual sugars of interest, such as those listed in 13.4, from reagent grade standards. Run the test mixture at various concentrations (≥ 5) such that all real samples will have peaks that fall on the calibration lines derived from this data. Note that sample concentrations are set by the dilution ratio used in 11.6, and make sure that they are given in ppm.

14.2 Prepare a mixture of the sugars of interest, in relative ratios similar to that expected from the sample, such that it will fall within the calibration range established in 14.1. Run this sample routinely as a control that is used to establish the standard error and control chart for the method.

⁴ Lists of companies that supply this equipment can be found in buyer's guides such as those published yearly by *American Laboratory* or *Analytical Chemistry*.

Annexe 3. Standard Test Method for Carbohydrate Distribution of Cellulosic Materials (3/3)



D5896 – 96 (Reapproved 2007)

15. Calculation or Interpretation of Results

15.1 Since cellulose is composed totally of anhydroglucose units, the repeat unit weight is 162. Hydrolysis of 100 mg of cellulose would theoretically give 111.1 mg of glucose (formula weight (FW) = 180). Other hexoses have the same relationship. Thus, hemicelluloses such as mannans, galactoglucomannans, and glucomannans can be backcalculated in a similar manner.

15.2 Hemicelluloses or gums that contain only pentoses have a repeat unit weight of 132. Thus, hydrolysis of 100 mg of xylan would theoretically give 113.6 mg of xylose (FW = 150). Hemicelluloses that contain both 6-carbon and 5-carbon sugars would have a repeat unit weight between 132 and 162, depending on composition.

15.3 In a similar manner, the composition of triacetates could be determined and the recovery calculated based on a repeat unit weight of 288 for cellulose triacetate, and 258 for xylan triacetate.

16. Report

16.1 Report the following information:

16.1.1 The amount of each sugar detected is reported in ppm. In addition, a distribution can be reported based on the percent of each sugar relative to the total, omitting the internal standard. Information on detection limits is given in Refs (2), (3), and (4),

16.1.2 For relatively clean samples, such as bleached pulp, the percent recovery should be calculated and reported. The percent recovery should be between 85 to 95 %.

17. Precision and Bias

17.1 Interlaboratory data has not been obtained.

17.2 Precision and bias (see (2) and (5)) will vary with the raw materials tested. For a bleached kraft Southern pine paper pulp, the following intralaboratory results were obtained from 10 replicate tests:

Sugar	ppm	SD	Percent	SD, %
arabinose	4.33	0.35	0.11	0.008
galactose	3.51	0.44	0.09	0.010
glucose	3305.93	94.86	86.95	0.184
mannose	206.93	6.67	5.44	0.107
xylose	281.49	6.04	7.41	0.131

where SD is the sample standard deviation.

17.3 Bias—Bias introduced by the hydrolysis procedure is not known. Since calibration is by known standards of known concentration, bias has been removed from the IC determination.

18. Keywords

18.1 carbohydrate; carbohydrate distribution; chromatography; distribution; hemicellulose; hydrolysis; ion chromatography; monosaccharides; PAD; sugars

REFERENCES

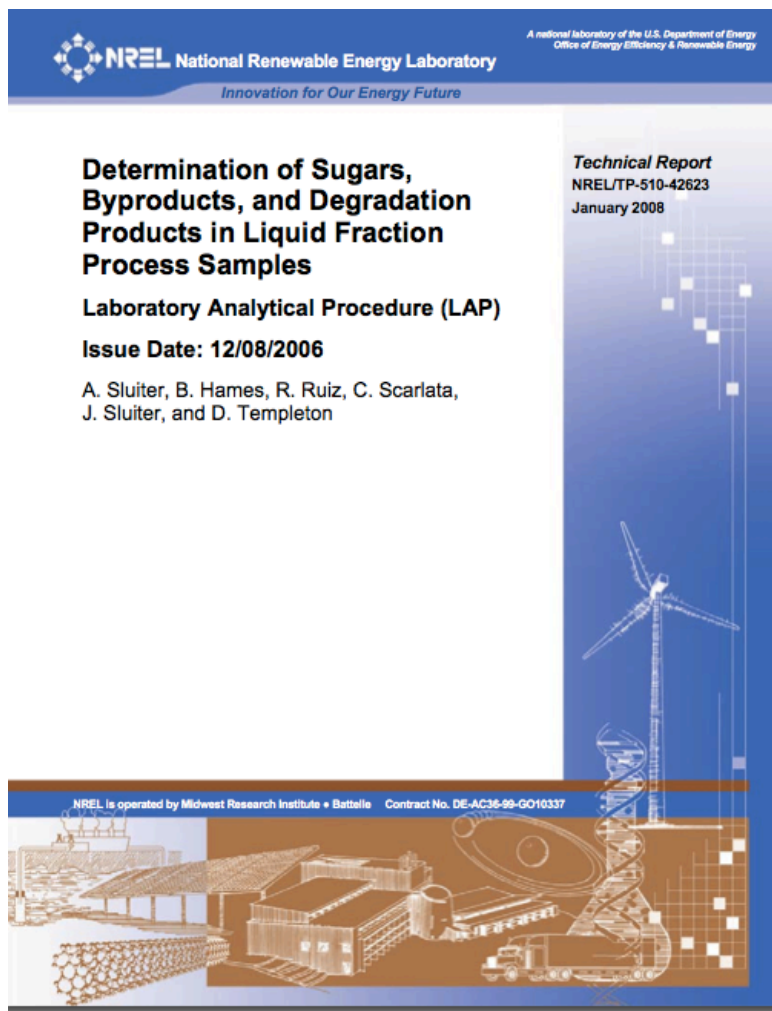
- (1) Lee, Y. C., *Analytical Biochemistry*, Vol 189, 1990, p. 151.
- (2) Pettersen, R. C. and Schwandt, V. H., *Journal of Wood Chemistry and Technology*, Vol 11, No. 4, 1991, p. 495.
- (3) Dionex Corp., "Dionex Technical Note," *TN20*, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, 1989.
- (4) Johnson, D. C. and LaCourse, W. R., *Analytical Chemistry*, Vol 62, 1990, p. 589A.
- (5) Sullivan, J. and Douck, M., *Journal of Chromatography*, Vol 671, No. 6, 1994, p. 339.

ASTM International takes no position respecting the validity of any patent rights asserted in connection with any item mentioned in this standard. Users of this standard are expressly advised that determination of the validity of any such patent rights, and the risk of infringement of such rights, are entirely their own responsibility.

This standard is subject to revision at any time by the responsible technical committee and must be reviewed every five years and if not revised, either reapproved or withdrawn. Your comments are invited either for revision of this standard or for additional standards and should be addressed to ASTM International Headquarters. Your comments will receive careful consideration at a meeting of the responsible technical committee, which you may attend. If you feel that your comments have not received a fair hearing you should make your views known to the ASTM Committee on Standards, at the address shown below.

This standard is copyrighted by ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2959, United States. Individual reprints (single or multiple copies) of this standard may be obtained by contacting ASTM at the above address or at 610-832-9585 (phone), 610-832-9555 (fax), or service@astm.org (e-mail); or through the ASTM website (www.astm.org). Permission rights to photocopy the standard may also be secured from the ASTM website (www.astm.org/COPYRIGHT/).

Annexe 4. Protocole de dépolymérisation standard des sucres (1/6)



**Determination of Sugars,
Byproducts, and Degradation
Products in Liquid Fraction
Process Samples**

Laboratory Analytical Procedure (LAP)

Issue Date: 12/08/2006

A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata,
J. Sluiter, and D. Templeton

Technical Report
NREL/TP-510-42623
January 2008

National Renewable Energy Laboratory
1617 Cole Boulevard, Golden, Colorado 80401-3393
303-275-3000 • www.nrel.gov

Operated for the U.S. Department of Energy
Office of Energy Efficiency and Renewable Energy
by Midwest Research Institute • Battelle
Contract No. DE-AC36-99-GO10337



Annexe 4. Protocole de dépolymérisation standard des sucres (2/6)

DISCLAIMER

These Standard Biomass Analytical Methods ("Methods") are provided by the National Renewable Energy Laboratory ("NREL"), which is operated by the Midwest Research Institute ("MRI") for the Department Of Energy.

Access to and use of these Methods shall impose the following obligations on the user. The user is granted the right, without any fee or cost, to use, copy, modify, alter, enhance and distribute these Methods for any purpose whatsoever, except commercial sales, provided that this entire notice appears in all copies of the Methods. Further, the user agrees to credit NREL/MRI in any publications that result from the use of these Methods. The names NREL/MRI, however, may not be used in any advertising or publicity to endorse or promote any products or commercial entity unless specific written permission is obtained from NREL/MRI. The user also understands that NREL/MRI is not obligated to provide the user with any support, consulting, training or assistance of any kind with regard to the use of these Methods or to provide the user with any updates, revisions or new versions.

THESE METHODS ARE PROVIDED BY NREL/MRI "AS IS" AND ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE ARE DISCLAIMED. IN NO EVENT SHALL NREL/MRI BE LIABLE FOR ANY SPECIAL, INDIRECT OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OR ANY DAMAGES WHATSOEVER, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO CLAIMS ASSOCIATED WITH THE LOSS OF DATA OR PROFITS, WHICH MAY RESULT FROM AN ACTION IN CONTRACT, NEGLIGENCE OR OTHER TORTIOUS CLAIM THAT ARISES OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE ACCESS, USE OR PERFORMANCE OF THESE METHODS.

Procedure Title: Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples

Laboratory Analytical Procedure

1. Introduction

- 1.1 Carbohydrates make up a major portion of biomass samples. These carbohydrates are polysaccharides constructed primarily of glucose, xylose, arabinose, galactose, and mannose monomeric subunits. During certain pretreatments of biomass, a portion of these polysaccharides are hydrolyzed and soluble sugars are released into the liquid stream. This method is used to quantify the total amount of soluble carbohydrates released into solution as well as the amount of monomeric sugars released into solution. The soluble sugars in the liquid fraction of process samples can be quantified by HPLC with refractive index detection. If the sugars are present in oligomeric form further processing into their monomeric units is required prior to HPLC analysis.
- 1.2 The liquid portion may also contain carbohydrate degradation products, such as HMF and furfural, as well as other components of interest, such as organic acids and sugar alcohols. This method is used to measure the level of these degradation products and byproducts. These components are analyzed by HPLC with refractive index detection to determine optimal production process parameters or to monitor ongoing processes.
- 1.3 The concentrations of monomeric sugars (soluble monosaccharides) and cellobiose, total sugars (monosaccharides and oligosaccharides), as well as carbohydrate degradation products and sugar alcohols can be determined using this procedure. Monomeric sugars are quantified by HPLC with refractive index detection. Oligomeric sugars are converted into the monomeric form using acid hydrolysis and quantified by HPLC with refractive index detection. Byproducts and degradation products are quantified by HPLC with refractive index detection.

2. Scope

- 2.1 This procedure is used to characterize liquid process samples, including pretreatment liquors, liquid fermentation samples, and liquid fractions of process solids.
- 2.2 This procedure is appropriate for biomass containing the components listed throughout the procedure. Any biomass containing other interfering components (such as co-eluting constituents) must be further investigated.
- 2.3 All analyses should be performed in accordance with an appropriate laboratory specific Quality Assurance Plan (QAP).

3. Terminology

- 3.1 None

4. Significance and Use

- 4.1 This procedure is used to determine the composition of liquid fraction process samples. Other optional procedures can be used in conjunction with this procedure, including a measure of acid soluble lignin in LAP "Determination of Structural Carbohydrates and

Annexe 4. Protocole de dépolymérisation standard des sucres (3/6)

- Lignin in Biomass".
- 4.2 This procedure is used, in conjunction with other procedures to determine the chemical composition of biomass samples, see LAP "Summative Mass Closure for Biomass Samples".
- 5. Interferences**
- 5.1 When analyzing for carbohydrate degradation products and sugar alcohols, the following interferences should be noted:
- 5.1.1 Arabinol coelutes with xylitol. If the sample is thought to contain arabinol, the experimentally determined xylitol concentration should be flagged as potentially being biased high due to the suspected arabinol component.
- 5.1.2 Some samples may contain sorbitol, which elutes about a minute earlier than xylitol on the Aminex HPX-87H column, and will appear as a peak in between the xylose and arabinose peaks.
- 5.1.3 Some samples may contain glycerol, which elutes at the same time as formic acid on the Aminex HPX-87H column.
- 5.2 Certain guard columns for carbohydrate quantification may cause artifact peaks. Individual carbohydrates should be run on new columns and guard columns to verify the absence of artifact peaks.
- 6. Apparatus**
- 6.1 Analytical balance, accurate to 0.1mg
- 6.2 pH meter, accurate to 0.01pH unit
- 6.3 Autoclave, suitable for autoclaving liquids, set to $121^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 6.4 HPLC system equipped with refractive index detector and the following columns:
- 6.4.1 Shodex sugar SP0810 or Biorad Aminex HPX-87P column (or equivalent) with ionic form H^+/CO_3^- deashing guard column
- 6.4.2 Biorad Aminex HPX-87H column (or equivalent) with corresponding guard column
- 7. Reagents and materials**
- 7.1 Reagents
- 7.1.1 High purity standards
- 7.1.1.1 D-cellobiose, D-(+)-glucose, D-(+)-xylose, D-(+)-galactose, L-(+)-arabinose, and D-(+)-mannose
- 7.1.1.2 Xylitol, succinic acid, L-lactic acid, glycerol, acetic acid, ethanol, 5-hydroxy-2-furaldehyde (HMF), and furfural
- 7.1.2 Second set of high purity standards, as listed above, from a different source (manufacturer or lot), to be used to prepare calibration verification standards (CVS)
- 7.1.3 Sulfuric acid, concentrated, ACS reagent grade
- 7.1.4 Sulfuric acid, 72% w/w (specific gravity 1.6338 at 20°C)- (also commercially available as a reagent for the determination of fluorine, from Fluka #00647)
- 7.1.5 Calcium carbonate, ACS reagent grade
- 7.1.6 Water, HPLC grade, $0.2\ \mu\text{m}$ filtered
- 7.2 Materials
- 7.2.1 Erlenmeyer flasks, 20 mL

- 7.2.2 Pressure tubes, minimum 65 mL capacity, glass, with screw on Teflon caps and o-ring seals (Ace glass # 8648-30 tube with #5845-47 plug, or equivalent) or glass bottles, autoclave safe, crimp to, with rubber stoppers and aluminum seals to fit
- 7.2.3 pH paper (range 2-9)
- 7.2.4 Disposable syringes, 3 mL, fitted with $0.2\ \mu\text{m}$ syringe filters
- 7.2.5 Autosampler vials with crimp top seals to fit
- 7.2.6 Volumetric pipets, class A, of appropriate sizes or corresponding pipettors
- 7.2.7 Volumetric flasks, class A, of appropriate sizes for standard and CVS dilution
- 7.2.8 Adjustable pipettors, covering ranges of $10\ \mu\text{L}$ to $10\ \text{mL}$

8. ES&H Considerations and Hazards

- 8.1 Sulfuric acid is corrosive and should be handled with care
- 8.2 Follow all applicable NREL chemical handling procedures

9. Sampling, Test Specimens and Test Units

- 9.1 Vigorously shake or vortex the sample to suspend any entrained solids. Samples may be filtered prior to analysis if entrained solids are not of interest.
- 9.2 Care must be taken to ensure a representative sample is taken for analysis at each step. When measuring volumes for analysis, the sample should be at room temperature.
- 9.3 Store samples in sealed containers so the volatile component concentration remains consistent. Samples should be stored in a refrigerator until ready to use.

10. Procedure

- 10.1 Measure and record the pH of each sample to the nearest 0.01 pH unit
- 10.2 Analyze the sample for byproducts and degradation products as follows
- 10.2.1 Prepare 0.005 M (0.01 N) sulfuric acid for use as a HPLC mobile phase. In a 2L volumetric flask, add 2.00 mL of standardized 10 N sulfuric acid and bring to volume with HPLC grade water. Filter through a $0.2\ \mu\text{m}$ filter and degas before use. If 10N sulfuric acid is not available, concentrated sulfuric acid may also be used. 278 μL concentrated sulfuric acid brought to volume in a 1L volumetric flask with HPLC grade water will also produce 0.005 M sulfuric acid.
- 10.2.2 Prepare a series of calibration standards containing the compounds that are to be quantified, referring to Table 1 for suggested concentration ranges. Use a four point calibration. If standards are prepared outside of the suggested ranges, the new range for these calibration curves must be validated. The linear range of HMF and furfural is limited by their solubility. Add these two components to the standards after the ethanol has been added to increase the HMF and furfural solubility. Filter the standard solutions through $0.2\ \mu\text{m}$ filters into autosampler vials. Seal and label the vials.
- 10.2.2.1 The retention times of xylitol and succinic acid are close. Test the column to verify adequate peak separation and quantification. If adequate separation is not achieved, regenerate or replace the column and confirm improved separation.
- 10.2.2.2 A fresh set of standards is not required for every analysis. A large batch of standards may be produced, filtered through $0.2\ \mu\text{m}$ filters into autosampler vials, sealed and labeled. The standards and CVS samples may be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex frozen standards prior to use. During every use,

Annexe 4. Protocole de dépolymérisation standard des sucres (4/6)

10.3 Analyze the sample for monomeric sugars and cellobiose as follows

10.3.1 Prepare a series of calibration standards containing the compounds that are to be quantified, referring to Table 2 for suggested concentration range. Use a four point calibration. If standards are prepared outside of the suggested ranges, the new range for these calibration curves must be validated.

10.3.2 Table 2- Suggested concentration ranges for 10.3.1 calibration standards

Component	Suggested concentration range (mg/ml)
D-cellobiose	1.2 – 24.0
D(+)-glucose	1.2 – 24.0
D(+)-xylose	1.2 – 24.0
D(+)-galactose	1.2 – 24.0
L(+)-arabinose	1.2 – 24.0
D(+)-mannose	1.2 – 24.0
CVS	Middle of linear range, concentration not equal to a calibration point (12.0 suggested)

Note: A larger concentration range is possible on some HPLC instruments.

10.3.3 A fresh set of standards is not required for every analysis. A large batch of standards may be produced, filtered through 0.2 µm filters into autosampler vials, sealed and labeled. The standards and CVS samples may be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex frozen standards prior to use. During every use, standards and CVS samples should be observed for unusual concentration behavior. Unusual concentrations may mean that the samples are compromised or volatile components have been lost. Assuming sufficient volume, standards and CVS samples should not have more than 12 injections drawn from a single vial. In a chilled autosampler chamber, the lifetime of standards and CVS samples is approximately three to four days.

10.3.4 Prepare an independent calibration verification standard (CVS) for each set of calibration standards. Use reagents from a source or lot other than that used in preparing the calibration standards. Prepare the CVS at a concentration that falls in the middle of the validated range of the calibration curve. The CVS should be analyzed on the HPLC after each calibration set and at regular intervals throughout the sequence, bracketing groups of samples. The CVS is used to verify the quality and stability of the calibration curve(s) throughout the run.

10.3.5 Measure and record pH or refer to step 10.1 for pH measurement. If the pH is less than 5, use calcium carbonate to neutralize an aliquot (10 mL is recommended) of each sample in an Erlenmeyer flask. Neutralize to pH 5 – 6. Avoid neutralizing to a pH greater than 6 by monitoring with pH paper. Add the calcium carbonate slowly upon

reaching a pH of 4. Swirl the sample frequently. After reaching pH 5 – 6, allow the sample to settle and decant off the clear liquid. The pH of the liquid after settling will be approximately 7. Samples with a pH greater than 9 cannot be analyzed using the HPX-87P column.

10.3.6 Prepare the sample for HPLC analysis by passing the decanted liquid through a 0.2 µm filter into an autosampler vial. Seal and label the vial. Prepare each sample in duplicate if desired. If it is suspected that the sample concentrations may exceed the calibration range, dilute the samples as needed, recording the dilution. The concentrations should be corrected for dilution after running. If necessary, neutralized samples may be stored in the refrigerator for three or four days. After this time, the samples should be considered compromised.

10.3.7 Analyze the calibration standards, CVS, and samples by HPLC using a Shodex sugar SP0810 or Biorad Aminex HPX-87P column equipped with the appropriate guard column.

HPLC conditions:

Injection volume: 10 – 50 µL, dependent on concentration and detector limits

Mobile phase: HPLC grade water, 0.2 µm filtered and degassed

Flow rate: 0.6 mL / minute

Column temperature: 80 - 85°C

Detector temperature: as close to column temperature as possible

Detector: refractive index

Run time: 20 minute data collection plus 15 minute post run (with possible adjustment for later eluting compounds)

Note: The deashing guard column should be placed outside of the heating unit and kept at ambient temperature. This will prevent artifact peaks in the chromatogram.

See sections 11.1 and 11.2 for calculations.

10.4 Analyze the sample for total sugar content (monosaccharides and oligosaccharides)

10.4.1 Refer to steps 10.3.1 through 10.3.4 for preparation of calibration standards and CVS samples. It is often useful to combine the analyses from 10.3 and 10.4 into one HPLC sequence.

10.4.2 Pipette duplicate representative aliquots of sample into a pressure tube, or autoclave safe bottle if pressure tubes are not available. Aliquots of 5.0, 10.0, or 20.0 mL may be used, depending on available sample volume.

10.4.3 Measure and record the pH of the sample or refer to step 10.1 for pH measurement. Based on sample pH, calculate the amount of 72% w/w sulfuric acid required to bring the acid concentration of each aliquot to 4% (refer to section 11.3 for example calculations and section 15.1 for a quick reference sheet). Add the required amount of acid while swirling the sample. Stopper the bottles and crimp aluminum seals into place. Using a permanent marker, label the aluminum seals with sample identification. Record the amount of acid added so the dilution of the solution can be accounted for.

10.4.4 Prepare a set of sugar recovery standards (SRS) that will be taken through the analysis and used to correct for losses due to decomposition of sugars during dilute acid hydrolysis. Refer to Table 3 for SRS concentration suggestions. SRS concentrations should be chosen to most closely resemble the concentrations of sugars in the sample.

Annexe 4. Protocole de dépolymérisation standard des sucres (5/6)

Weigh out the required amounts of each sugar, to the nearest 0.1 mg, and transfer to a crimp top bottle. Add 10.0 mL HPLC grade water.

10.4.5 Table 3- Suggested concentrations for 10.4.4 sugar recovery standards

SRS type	Sugar concentrations (mg / mL)				
	glucose	xylose	galactose	arabinose	mannose
High	40	100	20	20	10
Medium	20	50	10	10	5
Low	4	10	2	2	1

10.4.6 Add the appropriate amount of 72% sulfuric acid to each sugar recovery standard (refer to section 11.3 for example calculations). For a starting pH of 7, the amount of 72% sulfuric acid needed will be 348 μ L. Stopper the bottles and crimp aluminum seals into place. Using a permanent marker, clearly label the aluminum seals with sample identification.

10.4.7 A fresh SRS is not required for every analysis. A large batch of sugar recovery standards may be produced, filtered through 0.2 μ m filters, dispensed in 10.0 mL aliquots into sealed containers, and labeled. They may be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex the frozen SRS prior to use. If frozen SRS are used, the appropriate amount of acid must be added to the thawed sample and vortexed prior to transferring to a glass crimp top bottle.

10.4.8 Autoclave the sealed samples and sugar recovery standards for one hour at 121°C, usually the liquids setting. After completion of the autoclave cycle, allow the hydrolyzates to slowly cool to near room temperature before removing the seals and stoppers.

10.4.9 Use calcium carbonate to neutralize each sample to pH 5 – 6. Avoid neutralizing to a pH greater than 6 by monitoring with pH paper. Add the calcium carbonate slowly upon reaching a pH of 4. Swirl the sample frequently. After reaching pH 5 – 6, allow the sample to settle and decant off the clear liquid. The pH of the liquid after settling will be approximately 7.

10.4.10 Repeat steps 10.3.6 and 10.3.7, analyzing calibration standards, CVS, SRS, and samples. Refer to sections 11.1, 11.2, 11.4, and 11.5 for calculations.

10.5 Analyze the sample for acid soluble lignin content

10.5.1 See section 10.3 in LAP "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass" for a method for determining acid soluble lignin. Filter the liquor prior to this analysis if necessary.

11. Calculations

11.1 Create a calibration curve for each analyte to be quantified using linear regression. From these curves, determine the concentration in mg/mL of each component present in the samples analyzed by HPLC, correcting for dilution if required.

11.2 Calculate and record the amount of each calibration verification standard (CVS) recovered following HPLC analysis.

$$\% \text{ CVS recovery} = \frac{\text{conc. detected by HPLC, mg/mL}}{\text{known conc. of standard, mg/mL}} \times 100$$

11.3 For each sample and standard, calculate the volume of 72% sulfuric acid required to bring the acid concentration to a 4% final acid concentration. The molar concentration of hydrogen ions, $[H^+]$, in a sample, can be calculated from the pH as follows, $pH = -\log[H^+]$, therefore, $[H^+] = \text{antilog}(-pH)$.

The volume of 72% sulfuric acid needed is then calculated from the following equation:

$$V_{72\%} = \frac{[(C_{4\%} \times V_d) - (V_s \times [H^+] \times 98.08 \text{ g } H_2SO_4 / 2 \text{ moles } H^+)]}{C_{72\%}}$$

Where:

$V_{72\%}$ is the volume of 72% acid to be added, in mL.

V_s is the initial volume of sample or standard, in mL.

$C_{4\%}$ is the concentration of 4% w/w H_2SO_4 , 41.0 g/L.

$C_{72\%}$ is the concentration of 72% w/w H_2SO_4 , 1176.3 g/L.

$[H^+]$ is the concentration of hydrogen ions, in moles/L.

Example #1: Calculate the amount of 72% H_2SO_4 needed to prepare a sample with a pH of 2.41 for 4% acid hydrolysis. If the pH is 2.41, then $[H^+] = 0.00389 \text{ M}$. Therefore:

$$\frac{[(41.0 \text{ g/L}) \times (20 \text{ mL}) - (20 \text{ mL}) \times (0.00389 \text{ moles/L}) \times (98.08 \text{ g/2 moles})]}{1176.3 \text{ g/L}} = 0.694 \text{ mL}$$

Example #2: Calculate the amount of 72% H_2SO_4 needed to prepare a sugar recovery standard for 4% acid hydrolysis, assuming that the pH of the water is 7. If the pH is 7, $[H^+] = 0.0000001 \text{ M}$, a value small enough to be ignored in the following calculation.

$$(41.0 \text{ g/L} \times 20 \text{ mL}) / 1176.3 \text{ g/L} = 0.697 \text{ mL}$$

Also reference Appendix 1 for a quick reference sheet.

11.4 For the sugar recovery standards (SRS), calculate the amount of each component sugar recovered after dilute acid hydrolysis, accounting for any dilution made prior to HPLC analysis. Average any replicate ($\%R_{\text{avg, sugar}}$) values obtained for each individual sugar and report $\%R_{\text{avg, sugar}}$.

$$\% R_{\text{avg}} = \frac{\text{conc. detected by HPLC, mg/mL}}{\text{known conc. of sugar before hydrolysis, mg/mL}} \times 100$$

11.5 Use the percent hydrolyzed sugar recovery values calculated in step 11.3 to correct the corresponding sugar concentration values obtained by HPLC for each of the hydrolyzed samples ($C_{\text{cor, sample}}$), accounting for any dilution made prior to HPLC analysis, including the addition of sulfuric acid to adjust pH.

$$C_s = \frac{C_{\text{HPLC}} \times \text{dilution factor}}{\% R_{\text{avg, sugar}} / 100}$$

Annexe 4. Protocole de dépolymérisation standard des sucres (6/6)

Where:
 C_{HPLC} = conc. of a sugar as determined by HPLC, mg/mL.
 $\% R_{ave, sugar}$ = average recovery of a specific SRS component.
 $C_x = C_{cor. sample}$, concentration in mg/mL of a sugar in the hydrolyzed sample after correction for loss on 4% hydrolysis.

11.6 To report or calculate the relative percent difference (RPD) between two samples, use the following calculation

$$RPD = \left(\frac{X_1 - X_2}{X_{mean}} \right) \times 100$$

Where:

X_1 and X_2 = measured values
 X_{mean} = the mean of X_1 and X_2

11.7 To report or calculate the root mean square deviation (RMS deviation) or the standard deviation (st dev) of the samples, use the following calculations.
 First find the root mean square (RMS), of the sample using

$$RMS = x_m = mean = \sqrt{\left(\frac{\sum x^2}{n} \right)}$$

Then find the root mean square deviation, or standard deviation, using

$$RMSdeviation = \sigma = stdev = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_m)^2}{n}}$$

Where:

x_m = the root mean square of all x values in the set
 n = number of samples in set
 x_i = a measured value from the set

12. Report Format

12.1 Report concentrations, in mg / mL, of analytes of interest. RPD and RMS deviation may also be reported.

13. Precision and Bias

13.1 Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan.

14. Quality Control

- 14.1 Reported Significant Figures or Decimal Places: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan.
- 14.2 Replicates: Analyze for monomeric sugars and cellobiose in duplicate. All other analyses may be run in duplicate if desired.
- 14.3 Blank: An optional instrument blank may be run, using HPLC grade water analyzed by HPLC in the same manner as a sample.
- 14.4 Relative percent difference criteria: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan.
- 14.5 Calibration verification standard: Calibration verification standards should be independently prepared and analyzed as described in the procedure section.
- 14.6 Sample size: 15 – 80 mL (50 mL minimum recommended)
- 14.7 Sample storage: Store samples in sealed containers so the volatile component concentration remains consistent. Samples should be stored in a refrigerator. If necessary, neutralized samples may be stored in a refrigerator for three to four days. After this time the samples should be considered compromised. Neutralized samples may need to be refiltered after storage in a refrigerator if precipitate is visible.
- 14.8 Standard storage: The standards should be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex frozen standards prior to use.
- 14.9 Standard preparation: Standards should be prepared as described in the procedure.
- 14.10 Definition of a batch: Any number of samples which are analyzed and recorded together. Samples within a batch should be of the same matrix. The maximum size of a batch will be limited by equipment constraints.
- 14.11 Control charts: All CVS and SRS recoveries should be control charted.

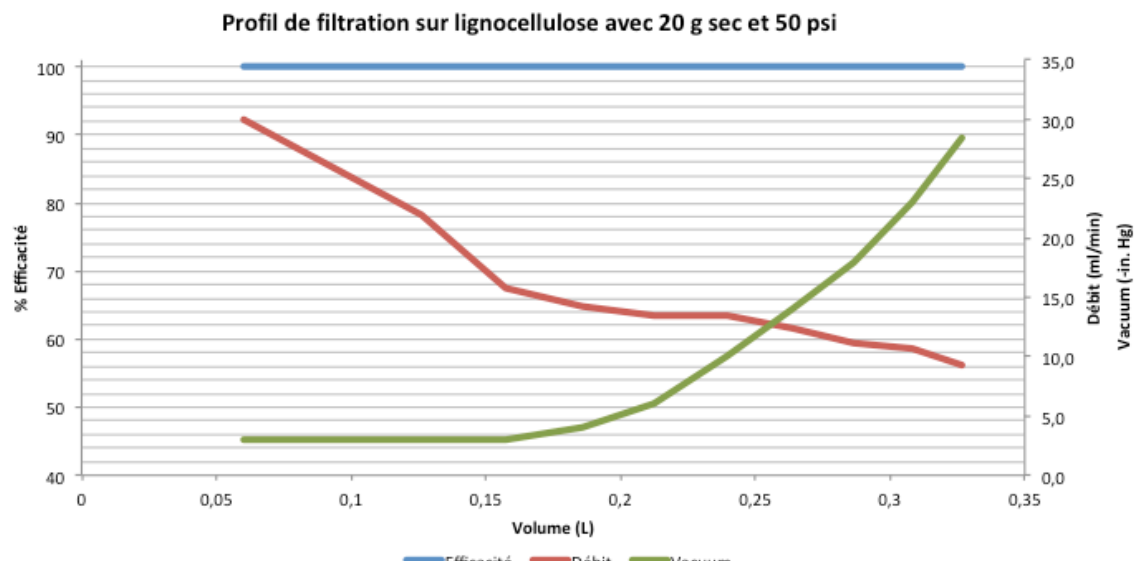
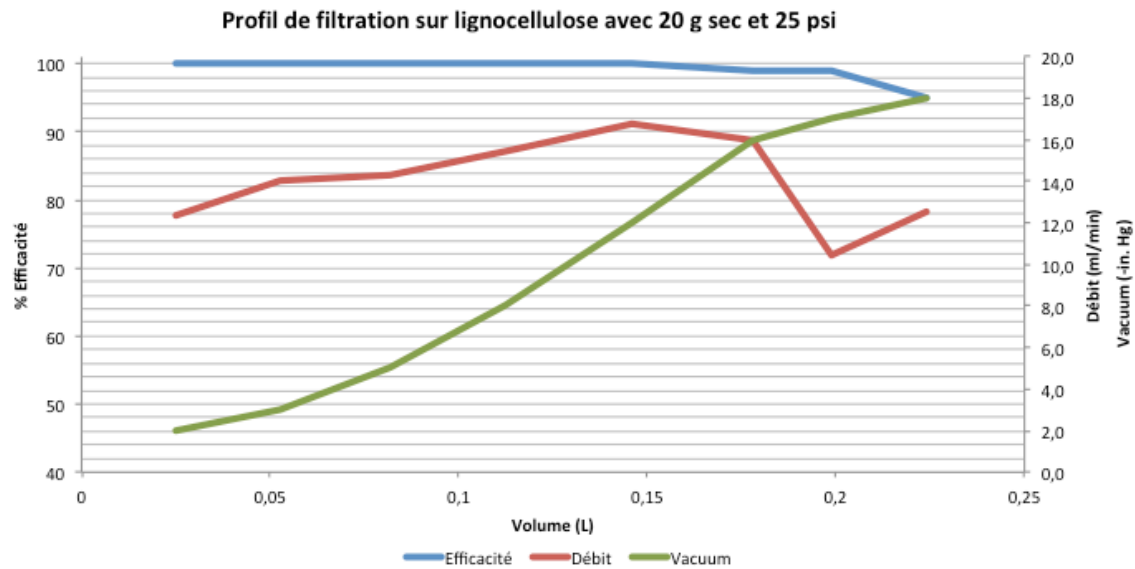
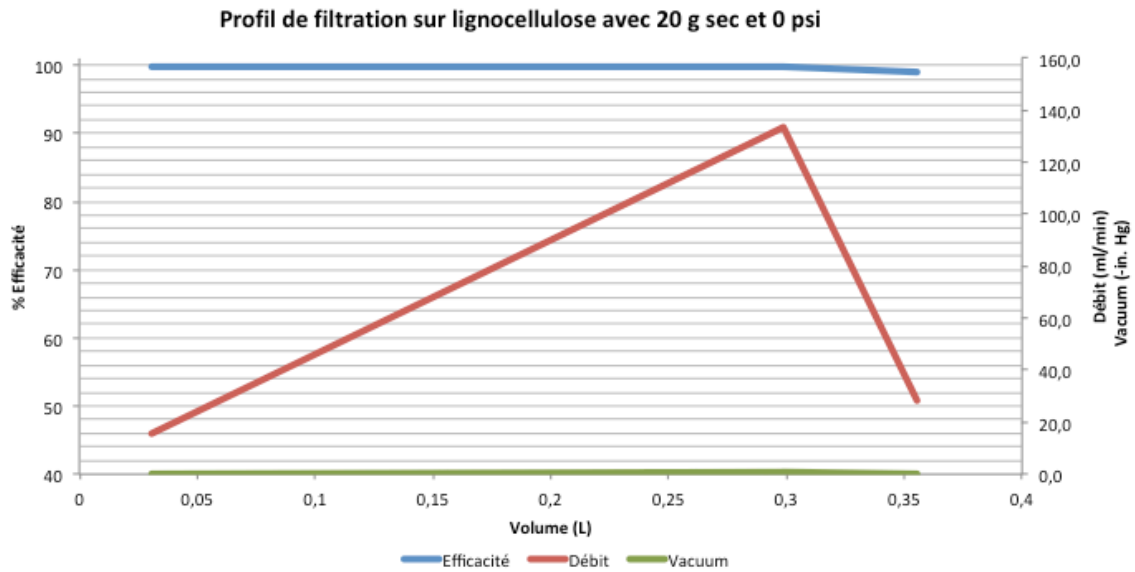
15. Appendices

- 15.1 See Appendix 1 at the end of the document for a quick reference sheet for calculation 11.3.

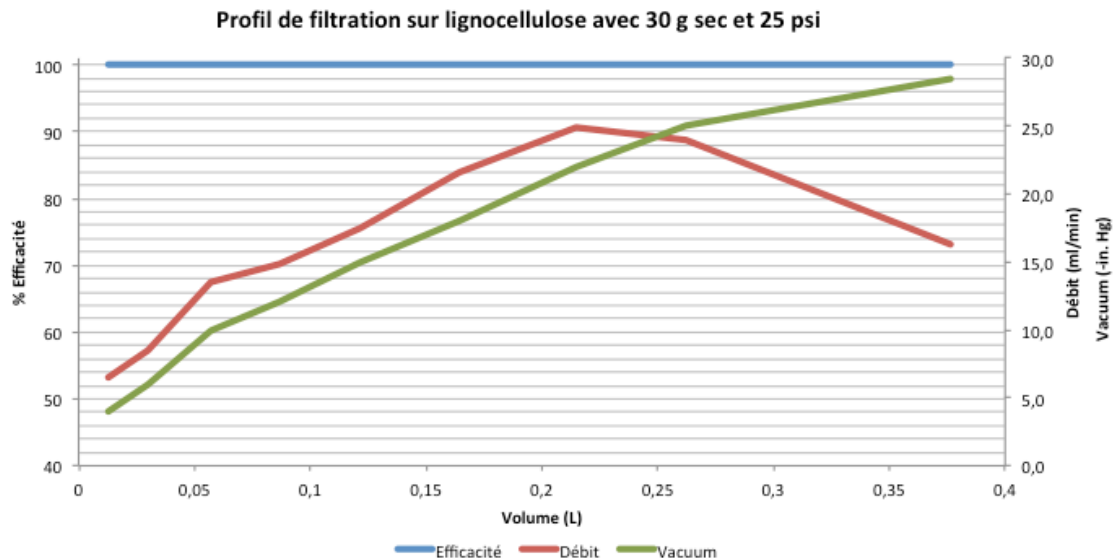
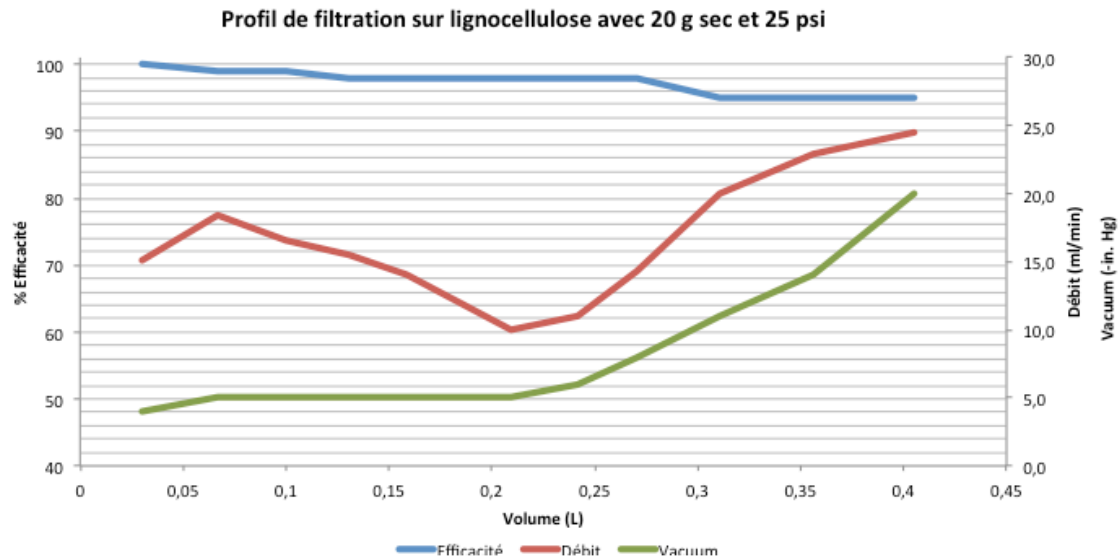
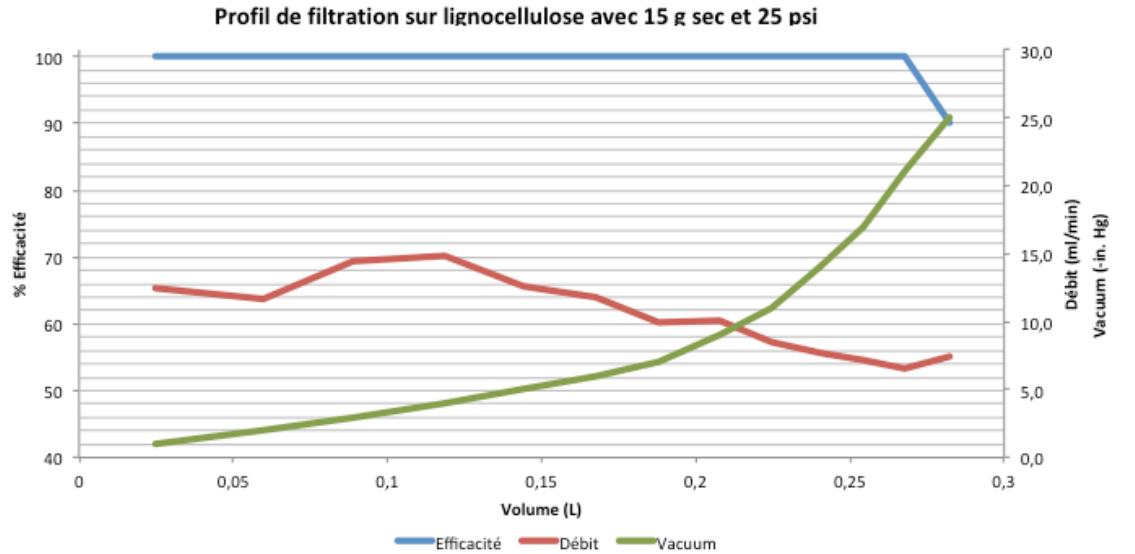
16. References

- 16.1 Ehrman, C.L. and M.E. Himmel. 1994. "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Pretreated Biomass: Improving Mass Balance Closure." *Biotechnology Techniques*, 8(2):99-104.
- 16.2 NREL Ethanol Project CAT Task Laboratory Analytical Procedure #013, "HPLC Analysis of Liquid Fractions of Process Samples for Monomeric Sugars and Cellobiose".
- 16.3 NREL Ethanol Project CAT Task Laboratory Analytical Procedure #014, "Dilute Acid Hydrolysis Procedure for Determination of Total Sugars in the Liquid Fraction of Process Samples".
- 16.4 NREL Ethanol Project CAT Task Laboratory Analytical Procedure #015, "HPLC Analysis of Liquid Fractions of Process Samples for Byproducts and Degradation Products".

Annexe 5. Graphiques de l'effet des différentes pressions sur l'efficacité, le débit et le vide nécessaire



Annexe 6. Graphiques de l'effet de la masse sur l'efficacité, le débit et le vide nécessaire

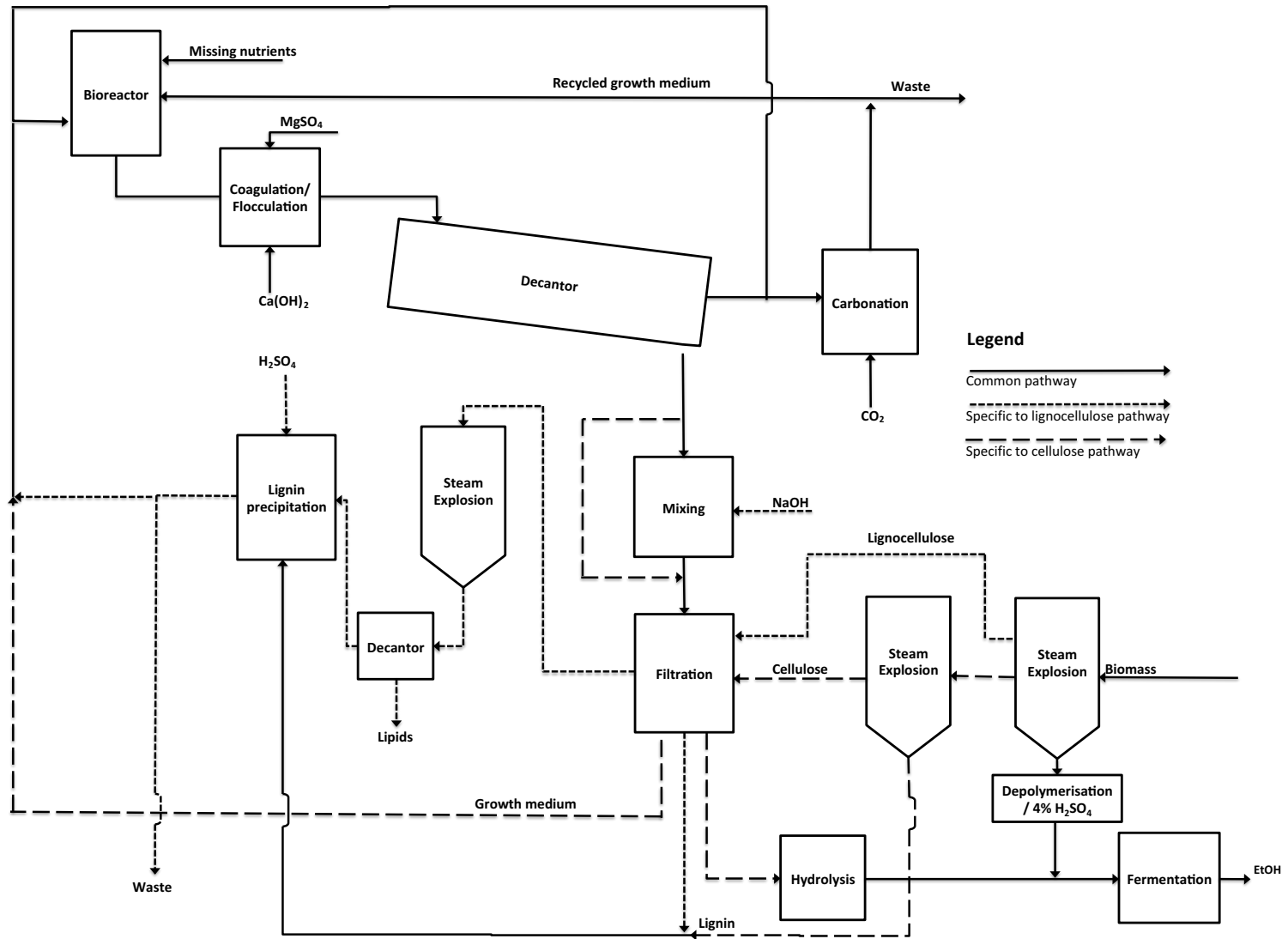


**Annexe 7. Caractérisation et méthodes de quantification de *Scenedesmus* sp.
AMDD fait par le CNRC (sur base humide)**

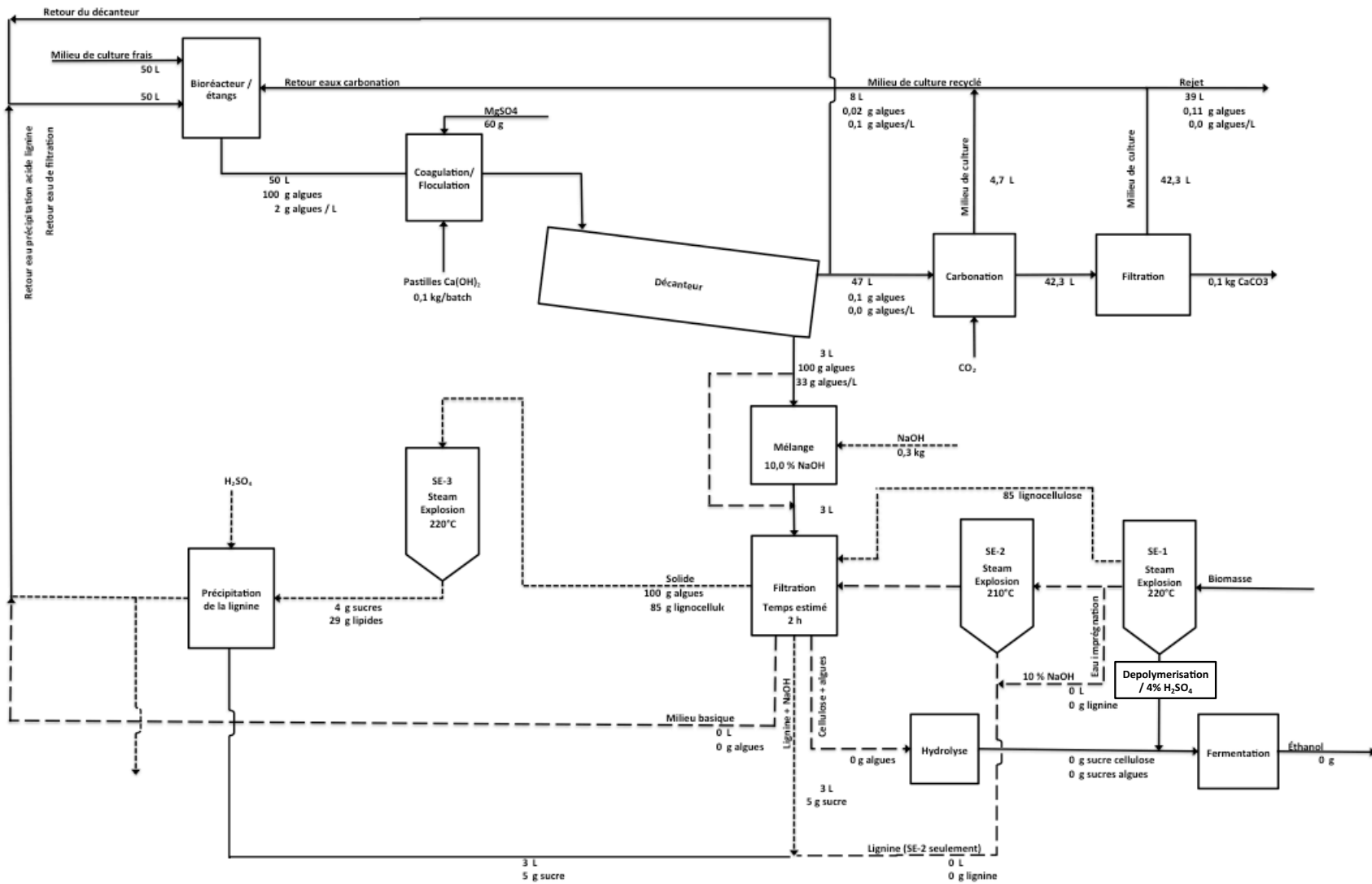
Scenedesmus sp. AMDD sample from Sherbrooke

Moisture = 6.3%	(105°C for 24 hours)
Ash = 2.8%	(550°C for 24 hours)
Nitrogen = 6.97%	(Elemental N on a Leco 528 nitrogen analyzer)
Crude lipid = 29.1%	(Soxhlet extraction with chloroform:methanol at 2:1)
Crude protein = 33.3%	(N × 4.78 according to Lourenco <i>et al.</i> , 2004)
Carbohydrate = 25.5%	(phenol-sulfuric acid method, Dubois <i>et al.</i> , 1956)

Annexe 8. Diagramme de procédé



Annexe 9. Bilan de masse du procédé



Liste des références

- Anachemia (2013). Fiche signalétique: NaOH,
<http://www.anachemia.com/msds/french/8370f.pdf> (pages consultée le 22/03/15)
- Bisalputra, T. et Weier, T. E. (1963). The Cell Wall of *Scenedesmus quadricauda*.
American Journal of Botany, volume 50, numéro 10, p. pp. 1011-1019.
- Brennan, L. et Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, volume 14, numéro 2, p. 557.
- Chen, W. H., Lin, B. J., Huang, M. Y. et Chang, J. S. (2014). Thermochemical conversion of microalgal biomass into biofuels: A review. *Bioresource technology*
- Chisti, Y. et Moo-Young, M. (1986). Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme and Microbial Technology*, volume 8, numéro 4, p. 194.
- Cormack, R. S. et Somssich, I. E. (1997). Ultra-fast alkaline lysis plasmid extraction (UFX). *Technical Tips Online*, volume 2, numéro 1, p. 151-152.
- Diop, C. I. K., Lavoie, J. et Huneault, M. A. (2015). Structural changes of *Salix miyabeana* cellulose fibres during dilute-acid steam explosion: Impact of reaction temperature and retention time. *Carbohydrate Polymers*, volume 119, numéro 0, p. 8.
- Dishon, M., Zohar, O. et Sivan, U. (2009). From Repulsion to Attraction and Back to Repulsion: The Effect of NaCl, KCl, and CsCl on the Force between Silica Surfaces in Aqueous Solution. *Langmuir*, volume 25, numéro 5, p. 2831-2836.
- Environmental Protection Agency (EPA) (2013), *Projection de consommation des biocarburants 2009-2020*, image tiré de
<http://www.lacoop.coop/cooperateur/articles/2013/04/p39.asp> (page consultée le 22/10/14)
- Golueke, C. G., Oswald, W. J. et Gotaas, H. B. (1957). Anaerobic Digestion of Algae. *Applied Microbiology*, volume 5, numéro 1, p. 47-55.
- Gouvernement du Canada (2014), *Règlement sur les carburants renouvelables*,
<http://laws-lois.justice.gc.ca/fra/reglements/DORS-2010-189/page-3.html#h-7>
(page consultée le 22/10/14)

- Gouvernement du Québec (2014), *Rapport de consultation de la Commission sur les enjeux énergétiques du Québec*, <http://consultationenergie.gouv.qc.ca/> (page consultée le 22/10/14)
- Gouvernement du Québec (2015), *Politique énergétique 2016-2025*, <http://mern.gouv.qc.ca/peq/fascicule-1.pdf> (page consultée le 16/03/2015)
- Guiry, M.D. (2015). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org> (page consultée le 19/03/15)
- Halim, R., Danquah, M. K. et Webley, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, volume 30, numéro 3, p. 709.
- Jacquet, N., Vanderghem, C., Danthine, S., Quievy, N., Blecker, C., Devaux, J. et Paquot, M. (2012). Influence of steam explosion on physicochemical properties and hydrolysis rate of pure cellulose fibers. *Bioresource Technology*, volume 121, p. 221-227.
- Krishnan, M., Ho, N. Y. et Tsao, G. (1999). Fermentation kinetics of ethanol production from glucose and xylose by recombinant *Saccharomyces* 1400(pLNH33). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, volume 78, numéro 1-3, p. 373-388.
- Lavoie, J. M., Beauchet, R., Berberi, V. et Chornet, M. (2011). Biorefining Lignocellulosic Biomass via the Feedstock Impregnation Rapid and Sequential Steam Treatment. *INTECH Publisher, Rijeka*, p. 685-711.
- Lavoie, J. et Beauchet, R. (2012). Biorefinery of *Cannabis sativa* using one- and two-step steam treatments for the production of high quality fibres. *Industrial Crops and Products*, volume 37, numéro 1, p. 275.
- Lavoie, J., Capek-Menard, E., Gauvin, H. et Chornet, E. (2010a). Production of pulp from *Salix viminalis* energy crops using the FIRSST process. *Bioresource Technology*, volume 101, numéro 13, p. 4940-4946.
- Lavoie, J., Capek-Menard, E., Gauvin, H. et Chornet, E. (2010b). Quality Pulp from Mixed Softwoods as an Added Value Coproduct of a Biorefinery. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, volume 49, numéro 5, p. 2503-2509.
- Lee, R. A., Berberi, V., Labranche, J. et Lavoie, J. (2014). Lignin extraction - Reassessment of the severity factor with respect to hydroxide concentration. *Bioresource Technology*, volume 169, p. 707.
- Lee, R. A. et Lavoie, J. (2013). From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontier*, volume 3, numéro 2, p. 6-11.

- Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie (MEDDE) (2014), *Énergie, Air et Climat*, <http://www.developpement-durable.gouv.fr/> (page consultée le 22/10/14)
- Minnesota Rural Water Association (MRWA) (2003), *Coagulation and flocculation* [http://www.mrwa.com/WaterWorksMnl/Chapter%2012%20Coagulation.p df](http://www.mrwa.com/WaterWorksMnl/Chapter%2012%20Coagulation.pdf) (page consultée le 04/11/14)
- Overend, R. P. et Chornet, E. (1987). Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, volume 321, numéro 1561, p. pp. 523-536.
- Petrusevski, B., Bolier, G., van Breemen, A. N. et Alaerts, G. J. (1995). Tangential flow filtration. A method to concentrate freshwater algae. *Water Research*, volume 29, numéro 5, p. 1419-1419.
- Schlesinger, A., Eisenstadt, D., Bar-Gil, A., Carmely, H., Einbinder, S. et Gressel, J. (2012). Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production. *Biotechnology Advances*, volume 30, numéro 5, p. 1023-1030.
- Schwenzfeier, A., Lech, F., Wierenga, P. A., Eppink, M. H. M. et Gruppen, H. (2013). Foam properties of algae soluble protein isolate: Effect of pH and ionic strength. *Food Hydrocolloids*, volume 33, numéro 1, p. 111-117.
- Show, K. Y., Lee, D. J. et Chang, J. S. (2013). Algal biomass dehydration. *Bioresource Technology*, volume 135, p. 720-729.
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M. et Hoadley, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy* 2, 012701-1.012701-15
- Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B. et Muylaert, K. (2012). Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource Technology*, volume 105, p. 114-119.
- Varela, C., Pizarro, F. et Agosin, E. (2004). Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 70, numéro 6, p. 3392-3400.
- Wu, Z., Zhu, Y., Huang, W., Zhang, C., Li, T., Zhang, Y. et Li, A. (2012). Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresource Technology*, volume 110, p. 496-502.